

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



**Petr Knotek**

**Mechanismy adaptace řas na široký gradient salinity;  
přechody mezi mořským a sladkovodním prostředím u chrysofyt**

Adaptation mechanisms to wide salinity gradient in algae;  
transitions between marine and freshwater environments in chrysophytes

Bakalářská práce

Školitel: doc. RNDr. Yvonne Němcová, Ph.D.

Praha, 2020

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 19. 5. 2020

Podpis:

**Poděkování:**

V první řadě bych rád poděkoval své školitelce doc. RNDr. Yvonne Němcové, Ph.D. za skvělé vedení mé práce a ochotu odpovídat na mé neustálé dotazy, a to i přesto, že odepisovala z druhé strany zeměkoule. Dále si velké díky zaslouží moje rodina za trpělivost a neutichající podporu v mém psaní. A nakonec bych chtěl poděkovat mojí skvělé přítelkyni Aničce, která tu pro mě celou dobu byla, motivovala mě a přiměla mě napsat toto poděkování.

## Abstrakt

Přechod z mořského do sladkovodního prostředí a naopak, představuje klíčovou událost v evoluci organismů. Přestože jsou tyto přechody z evolučního hlediska relativně vzácné, většina velkých skupin organismů podstoupila tuto událost minimálně jednou. Mořské a sladkovodní prostředí se liší v mnoha aspektech, především salinitou. Při přechodu mezi oběma prostředími musí organismy překonat výrazný gradient salinity a přizpůsobit se změnám osmotického potenciálu. Nemalou roli však hrají i biotické faktory, a to zejména kompetice a predace v novém prostředí. Cílem bakalářské práce je poskytnout ucelenou informaci o mechanismech adaptace na široký gradient salinity u řas obecně a zaměřit se na přechody mezi mořským a sladkovodním prostředím u chrysofyt, ke kterým došlo v evoluci opakovaně a relativně často.

**Klíčová slova:** chrysofyta, Chrysophyceae, gradient salinity, osmoregulace, přechod mořské-sladkovodní prostředí

## Abstract

The transition from the marine to the freshwater environment and vice versa is a key event in the evolution of organisms. Although these transitions are relatively rare from an evolutionary point of view, most large groups of organisms have undergone this event at least once. The marine and freshwater environment differs in many aspects, especially salinity. During the transition between these two environments, the organisms are forced to overcome a significant salinity gradient and adapt to changes in the osmotic potential. However, biotic factors also play an important role, especially competition and predation in the new environment. The aim of the bachelor 's thesis is to provide comprehensive information on the mechanisms of adaptation to a wide gradient of salinity in algae in general and to focus on freshwater-marine transitions in chrysophytes, that occurred repeatedly and relatively frequently in the course of evolution.

**Key words:** chrysophytes, Chrysophyceae, salinity gradient, osmoregulation, marine-freshwater transition

# Obsah

|   |    |
|---|----|
| Abstrakt .....  | 4  |
| Úvod .....  | 6  |
| 1 Sladkovodní a mořské prostředí .....                              | 7  |
| 1.1 Mořské prostředí.....   | 7  |
| 1.2 Sladkovodní prostředí.....                                      | 8  |
| 2 Bariéra mezi sladkovodním a mořským prostředím.....               | 8  |
| 2.1 Salinita.....   | 8  |
| 2.2 Ekologické faktory .....  | 9  |
| 3 Morfologická komplexita a její vliv na přechody .....             | 9  |
| 3.1 Jednodušší morfologie, úspěšnější přechody .....                | 10 |
| 3.2 Problematika biogeografie protist .....                         | 10 |
| 4 Mořský vs. sladkovodní původ fotosyntetických eukaryot.....       | 11 |
| 4.1 Původ z hlediska plastidu .....                                 | 11 |
| 4.2 Původ z hlediska hostitele .....                                | 13 |
| 5 Adaptace na široký gradient salinity .....                        | 14 |
| 5.1 Genetická adaptace.....   | 15 |
| 5.1.1 Konstitutivní genetické změny.....                            | 15 |
| 5.1.2 Indukované genetické změny .....                              | 15 |
| 5.2 Fyziologické adaptace .....                                     | 16 |
| 5.2.1 Osmoregulace.....   | 16 |
| 5.2.2 Fotosyntetická aktivita .....                                 | 19 |
| 5.2.3 Pohlavní rozmnožování.....                                    | 20 |
| 5.3 Morfologické adaptace .....                                     | 20 |
| 5.3.1 Sulfatované polysacharidy v buněčné stěně.....                | 21 |
| 5.3.2 Palmelloidní stádia u zelených řas .....                      | 22 |
| 6 Scénáře přechodů .....  | 23 |
| 7 Přechody mezi mořským a sladkovodním prostředím u chrysofyt ..... | 24 |
| 7.1 Obecná charakteristika chrysofyt .....                          | 24 |
| 7.2 Mořská chrysofyta.....  | 25 |
| 7.3 Hypotéza překročení Rubikonu.....                               | 26 |
| Závěr.....  | 29 |
| Bibliografické citace.....  | 30 |

## Úvod

Přechody mezi mořským a sladkovodním prostředím představují u vodních organismů jednu z klíčových událostí, která významně ovlivňuje jejich evoluci. Z evolučního hlediska si lze pro představu přirovnat oceány ke kontinentům a sladké vody k ostrovům. Toto přirovnání však nebere v potaz, že mořské a sladkovodní prostředí se navzájem liší svými obecnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi natolik, že v suchozemském prostředí bychom jen marně hledali paralelu. Vytváří tak mezi sebou jednu z nejhůře zdatelných přírodních bariér, která brání přechodům i u protistních druhů, a to i navzdory jejich početným populacím, schopnostem disperze na velké vzdálenosti či velké rychlosti množení (Logares et al. 2009).

Historie přechodů mezi těmito prostředími započala pro fotosyntetická eukaryota pravděpodobně na sladkovodní straně této bariéry. Lze tak usuzovat ze sladkovodního výskytu sinice *Gloeomargarita lithophora*, která je nejbližší známý příbuzný recentních plastidů (Ponce-Toledo et al. 2017) a podobného výskytu většiny zástupců Glaukofyt, jakožto pravděpodobně bazální linie Archaeplastida (Reyes-Prieto and Bhattacharya 2007). Dnes řasy najdeme v hojném zastoupení v obou prostředích a některé z nich se dokonce vyskytují v širokém gradientu salinity. Jedná se o euryhalinní řasy, které jsou prostřednictvím změn ve svém proteomu schopné ovlivňovat osmoregulaci, fotosyntetickou aktivitu, tvorbu pohlavních útvarů či svou morfologii. Přičemž tyto adaptace na široký gradient salinity se zdají být pro přechod mezi mořským a sladkovodním prostředím klíčové.

Díky novým fylogenetickým analýzám a popisování nových druhů přibývají data, která nám často pomáhají rozklíčovat vztahy mezi mořskými a sladkovodními liniemi. Následně pak můžeme z fylogenetických stromů odvozovat scénáře přechodů k jakým v minulosti ve studované linii docházelo. Příkladem mohou být chrysofyta, kterým se věnuje poslední kapitola této bakalářské práce. Ačkoliv je drtivá většina druhů této linie popsána ze sladkých vod, prostřednictvím enviromentálního sekvenování, popisování nových druhů a následné fylogenetické analýzy se ukázalo, že mořská diverzita této skupiny je mnohem větší, než se dříve předpokládalo a že k přechodům mezi mořem a sladkou vodou docházelo u chrysofyt průběžně a relativně často.

# 1 Sladkovodní a mořské prostředí

Salinita je jedna z nejdůležitějších charakteristik povrchové vody, jež podstatně ovlivňuje její biotu. Rozděluje vodní habitaty do dvou hlavních skupin, a to na sladké a slané. Tato prostředí jsou ovšem na Zemi zastoupená ve značném nepoměru. Přibližně 97,6 % veškeré vody na zemi je slané a pouze 2,4 % náleží vodě sladké, přičemž naprostá většina sladké vody je podzemní či ve formě ledu. A ačkoliv povrchová sladká voda tvoří pouze zbylých 0,009 % hydrosféry, je toto prostředí z pohledu evoluční historie neméně významné.

Jeden z hlavních přírodních procesů, způsobující rozdílnou salinitu mezi vodními tělesy je velký hydrologický cyklus, při němž dochází k přesunům vody mezi světovým oceánem a pevninou. Díky působení sluneční energie se odpařuje voda z hladiny oceánu, čímž v něm zvyšuje koncentraci solí. Ve formě srážek poté část dopadne na pevninu, kde se pomalu hromadí a postupně odtéká zpět do oceánu. S sebou přináší rozpuštěné soli a živiny, což v oceánech vede k dalšímu nárůstu salinity. Ve výsledku se díky těmto procesům zastoupení biogenních prvků a sloučenin mezi oběma prostředími výrazně liší.

## 1.1 Mořské prostředí

Nejprve je důležité si uvědomit, že slaná voda není pouze koncentrovaná verze vody sladké. Oproti sladkovodnímu prostředí je zde primární produkce limitována především dostupností dusíku nebo stopovými prvky jako je železo a převažují zde sodné ionty ( $\text{Na}^+$ ). Eluované vápenaté ionty ( $\text{Ca}^{2+}$ ) se totiž ve vodních tocích snadno vysráží a usadí jako uhličitan vápenatý ( $\text{CaCO}_3$ ), zatímco sodné ionty ( $\text{Na}^+$ ) zůstávají rozpuštěné a putují až do moře. Avšak hlavním rozdílem je samozřejmě celkově vyšší koncentrace solí. O slané vodě mluvíme tehdy, pokud je její salinita vyšší než 30 g rozpuštěných solí/L, přičemž současný průměr salinity světového oceánu činí 35 g rozpuštěných solí/L. Ale nebylo tomu tak vždy, v posledních 600 milionech let jeho salinita oscilovala v rozmezí mezi 30 až 60 g rozpuštěných solí/L (Hay et al. 2006).

Také obecně převažuje názor, že život vznikl právě v hypersalinním oceánu se salinitou nad 80 g rozpuštěných solí/L. Odtud poté život postupně kolonizoval sladkovodní a později terestrické prostředí (Martin et al. 2008). Nasvědčuje tomu také fakt, že koncentrace iontů v tělních tekutinách je obdobná jako u mořské vody (Pinti 2005). Existuje ovšem i alternativní scénář ve kterém život pochází ze sladkovodního prostředí a moře kolonizoval až sekundárně (Wellman and Strother 2015). Kolonizace mořských habitatů pak mohla být pouze odpověď na nepříznivé podmínky na povrchu planety.

## 1.2 Sladkovodní prostředí

Sladké vody mají salinitu nižší než 0,5 g rozpuštěných solí/L (světový průměr činí 0,12g/L rozpuštěných solí), jejich primární produkce je limitována převážně dostupností fosforu a převažují zde vápenaté ionty ( $\text{Ca}^{2+}$ ). Od víceméně homogenního mořského prostředí se však odlišuje hlavně svou vysokou variabilitou. Složení sladkovodního prostředí totiž záleží mnohem více na jeho okolí a oproti mořskému prostředí je podstatně více ovlivňováno faktory jako jsou chemické interakce s půdou, geologický kontext, kvalita a kvantita srážek, teplota, dostupnost živin a dalšími. Jejich působení může ovlivnit i salinitu a zastoupení iontů. Například u vodních těles, kde převažuje zásobení podzemní vodou, je koncentrace solí z většiny ovlivněna složením podloží. Zpravidla jsou také bohaté na křemík a draslík a nachází se ve vyšších nadmořských výškách. Oproti tomu tam kde převažují v přísunu vody srážky, má voda složení iontů podobné jako voda mořská, a to i hluboko ve vnitrozemí (Ronald 1970).

## 2 Bariéra mezi sladkovodním a mořským prostředím

Prostředí s rozdílnými podmínkami pro život od sebe oddělují pomyslné bariéry. A obzvláště tu mezi mořským a sladkovodním prostředím je velmi nesnadné překonat. Obtíže při přechodu spojené převážně s rozdílnými fyzikálně-chemickými podmínkami v obou prostředích sdílí vodní organismy napříč fylogenetickým systémem (Lee and Bell 1999). Tudíž k přechodům mezi těmito prostředím dochází jen velmi zřídka a naprostá většina jich proběhla z evolučního hlediska již velmi dávno. Nepřekvapí tedy, že mořské a sladkovodní organismy si nejsou obvykle blízké příbuzné a často se sdružují do odlišných mořských a sladkovodních fylogenetických linií (Cavalier-Smith 2009).

### 2.1 Salinita

Hlavní fyzikálně-chemický faktor, který tvoří bariéru mezi sladkovodním a mořským prostředím je salinita. Její změna ovlivňuje zvláště metabolické pochody a zvyšuje energetické náklady na osmoregulaci (Oren 2001). V důsledku pak má pravděpodobně i vliv na distribuci a evoluci taxonů, což dokazují studie z ústí řek, které ukázaly, že změny v druhovém složení mikrobiálních společenstevch v závislosti na salinitě jsou spíše drastické než postupné (Bouvier 2002). Podobných výsledků se dosáhlo i během laboratorního pokusu, při kterém se sledovala změna druhového složení mikrobiálního společenstva z přílivové zóny v závislosti na salinitě vody, kterou byl substrát promýván (Coci et al. 2005). Vliv salinity na druhové složení byl pozorován také u protistních linií. Příkladem mohou rozsivky či chrysofyta s křemičitými strukturami, u kterých společně s rostoucí salinitou klesala jejich druhová diverzita (Němcová



et al. 2016; Underwood et al. 1998). Lze tedy soudit, že složení mikrobiálních a protistních společenstev ovlivňuje nejvíce salinita, nikoliv teplota nebo pH (Lozupone and Knight 2007).

## 2.2 Ekologické faktory

Při přechodu do nového prostředí se nově přichozí druh musí vyrovnat nejen s rozdílnými fyziologickými podmínkami, ale také být schopen konkurovat již adaptovaným místním organismům. To ovšem není jednoduché, jelikož obecně platí, že dobře adaptované původní organismy jsou ve svém habitatu v kompetiční výhodě oproti vetřelcům z jiných prostředí. Nově přichozí druhy se navíc nejčastěji vypořádávají s novým prostředím navozením jakéhosi pasivního stavu. Obvykle vypnou řadu metabolických procesů a vyčkávají, dokud se okolní podmínky opět nevrátí do hodnot, na které je adaptována jejich fyziologie (Vermeij and Dudley 2000). Jinými slovy, mnoho organismů je po přechodu do rozdílného prostředí neaktivních, a tedy i neschopných kompetice. A tak pouze u těch organismů, které i po přechodu do rozdílného prostředí zůstanou aktivní, lze očekávat, že zvládnou kompetovat s již adaptovanými původními druhy.

Velký vliv na úspěšnost přechodů má také druhové složení místního společenstva. Z ekologických studií vyplývá, že společenstva s vyšší diverzitou a větším počtem specializovaných druhů jsou více odolná proti invazím. Důvodem je především obsazenost většiny možných ekologických nik místními druhy. Tímto lze také zdůvodnit, proč většina přechodů z mořského do sladkovodního prostředí proběhla v době, kdy nově vznikající sladkovodní tělesa měla oproti oceánu chudší biotu a mořské invazní druhy tak měli k dispozici velké množství volných ekologických nik (Vermeij and Dudley 2000).

## 3 Morfologická komplexita a její vliv na přechody

Při zkoumání přechodů u skupiny organismů jako jsou řasy, musíme brát v potaz i jejich značnou různorodost. Jelikož jde o polyfyletickou skupinu zahrnující mnoho nepříbuzných taxonů napříč celým eukaryotickým systémem, lze mezi řasovými zástupci nalézt jak morfologicky jednoduché jednobuněčné organismy, tak i mnohobuněčné se stélkou, která se svou morfologickou složitostí podobá vyšším rostlinám. A právě morfologická komplexita a její důsledky mají na četnost a úspěšnost přechodů mezi prostředími nepochybně podstatný vliv.

### 3.1 Jednodušší morfologie, úspěšnější přechody

Z hlediska morfologické komplexity lze organismy základně rozdělit na mnohobuněčné a protista. Při porovnání, která z těchto morfologií je úspěšnější při přechodech, lze vycházet z obecně platného názoru, že k úspěšné kolonizaci prostředí přispívá především počet kolonizátorů a schopnost jejich disperze (Martiny et al. 2006). A právě protista oproti většině mnohobuněčných organismů disponují početnějšími populacemi (Weisse 2008), jsou snáze roznášeny na větší vzdálenosti (Falkowski et al. 2008) a také se rychleji množí (Giovannoni and Stingl 2005). Není tedy divu, že i mnohobuněčným makrořasám slouží k šíření převážně jednobuněčná stadia jako gamety, spory, cysty a jim podobné. Mnoho teoretických modelů navíc podporuje myšlenku, že mikrobiální společenstva mají i vyšší genetickou diverzitu (Mes 2008). Genotypově bohatší invazní linie má pak větší šanci, že jedna z genových kombinací se po vystavení novým životním podmínkám ukáže jako vhodná pro život na novém stanovišti a přispěje tak k úspěšné invazi. To, že jednobuněčné organismy mohou lépe zdolávat enviromentální bariéry a počet jejich úspěšných invazí je vyšší, vyplynulo i z článku Logares et al. (2009), který shrnuje danou problematiku.

### 3.2 Problematika biogeografie protist

To, s jakou lehkostí mohou protista zdolávat enviromentální bariéry a přizpůsobovat se rozdílným podmínkám, nabádá k otázce, zda vůbec nějaké z těchto bariér brání volně žijícím protistům v jejich kosmopolitním rozšíření. O zodpovězení této otázky se pokusil nizozemský mikrobiolog Lourens Baas Becking, který na základě svých pozorování zjistil, že ve slaných jezerech po celém světě žijí stejná protista adaptovaná na toto extrémní prostředí. Toto zjištění ho roku 1934 dovedlo k vyslovení hypotézy: „Všechno je všude, ale prostředí je limitující.“ (De Wit and Bouvier 2006). První část tohoto ubikvitního modelu biogeografie protist poukazuje na fakt, že bariéry nehrají v rozšiřování mikrobů zásadní roli, a to jak v lokálním, tak globálním měřítku. Tato hypoteticky neomezená disperze přiměla mnoho výzkumných týmů k názoru, že mořské a sladké vody byly osídleny prakticky stejnými mikrobiálními taxony (Hahn 2006).

Avšak současné výzkumy zjišťují, že mnoho protistních druhů má jen omezený výskyt. Tato zjištění sice podporují Baas-Beckingovu myšlenku, že prostředí je limitujícím prvkem v šíření mikrobů a také částečně odpovědné za prostorovou variabilitu mikrobiální diverzity, avšak popírají druhou část jeho hypotézy „všechno je všude“ (Cho and Tiedje 2000). Kompromisem je recentně preferovaný umírněný ubikvitní model, který sice připouští, že většina protist má kosmopolitní rozšíření, ale dává důraz i na skutečnost, že enviromentální bariéry měli vliv na jejich rozšíření a existují tedy i protistní endemické druhy (Foissner 1999).

## 4 Mořský vs. sladkovodní původ fotosyntetických eukaryot

Chceme-li se zabývat přechody mezi mořem a sladkými vodami u fotosyntetických eukaryot, musíme se nejdříve pokusit o určení prostředí ve kterém vznikla. Pokud zjistíme, v jakém prostředí mají původ, dostaneme rázem i odpovědi na otázky, které přímo souvisejí s přechody mezi sladkovodním a mořským prostředím. Zejména na jaké prostředí byl primárně adaptován jejich předek a v jakém směru probíhal první přechod mezi těmito prostředími.

Obecně se předpokládá, že k primární endosymbióze došlo mezi sinicí (Cyanobacteria) a společným předchůdcem zelené (Viridiplantae), červené (Rhodophyta) a glaukofytní (Glaucophyta) linie (Rodríguez-Ezpeleta et al. 2005). Až poté byl plastid přenášen pomocí sekundární až komplexní endosymbiózy na ostatní fotosyntetické linie (Archibald 2009). Nejspíše k tomu tak došlo zhruba před 2100 až 900 miliony let. Odhady se liší v závislosti na použitých metodách či rozdílné interpretaci fosilií (Cavalier-Smith 2009; McFadden 2014). V jakých fyzikálních podmínkách k této události došlo je však zatím nejisté. Leccos lze ale odvodit z bližšího prozkoumání organismů blízkce příbuzných těm, u kterých k této události došlo.

### 4.1 Původ z hlediska plastidu

Sinice (Cyanobacteria), jakožto jediná známá prokaryota schopná oxidativní fotosyntézy, nejen zásadně pozměnily biochemické cykly na planetě (Falkowski et al. 2008), ale také daly vzniknout chloroplastu (Keeling 2010). Nejen z těchto důvodů je pochopení evoluční historie sinic stěžejní pro objasnění podmínek, za kterých vznikla a diverzifikovala první fotosyntetizující eukaryota.

Nejdříve je potřeba se zeptat, v jakém prostředí mají původ samotné sinice. Studie Dagan et al. (2013) se při hledání odpovědi zaměřila na fotosyntetický aparát. Díky porovnání genomů vybraných sinic pak dospěla k názoru, že pro vznik fotosyntézy využívající hydrolýzu je pravděpodobně nutný sladkovodní původ. Sladkovodnímu původu také nasvědčuje studie provádějící fylogenetickou analýzu genů kódující osmolity (Blank 2013). Ukazuje, že geny pro syntézu sacharózy jsou u sinic ancestrální, přičemž syntéza sacharózy je silně spojená s růstem v prostředí s nízkou salinitou. Kromě toho geny pro syntézu dalších osmolitů nutných pro přežití v mořském a hypersalinním prostředí (např.: glukosylglycerol, glukosylglycerát a trimethylglycin) byly pravděpodobně získávány až mnohem později. Musíme brát v potaz i fakt, že v porovnání s dneškem byla teplota i salinita prekambričských oceánů mnohem vyšší

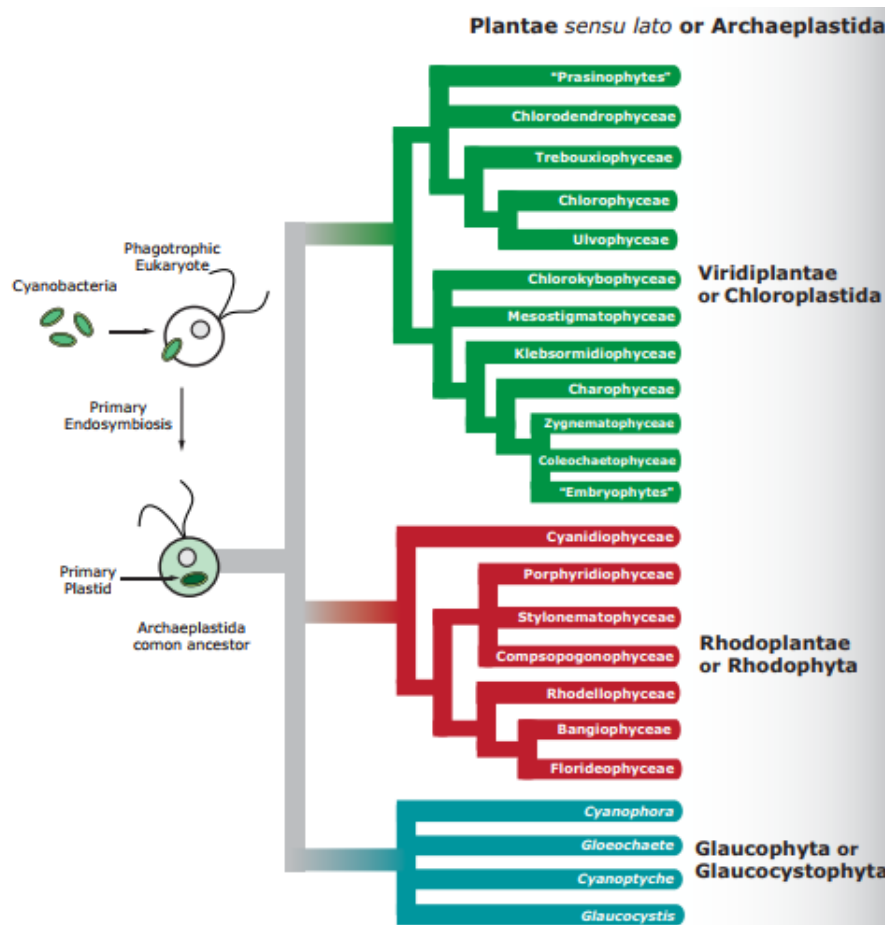


## 4.2 Původ z hlediska hostitele

Eukaryotní organismus účastníci se primární endosymbiózy byl velice pravděpodobně společným předkem Archaeplastid (Rodríguez-Ezpeleta et al. 2005), avšak historie bazálního větvení této superskupiny zatím není zcela známa (Jackson and Reyes-Prieto 2014). I přes to se za bazální linii považují Glaucophyta a to nejen z důvodu primitivní morfologie jejich plastidů (Reyes-Prieto and Bhattacharya 2007). Z faktu, že zástupci této linie se vyskytují téměř výhradně ve sladkých vodách (Jackson et al. 2015), můžeme usuzovat, že z podobného prostředí pocházel i jejich předek. Podobně tak lze postupovat i u linie červených řas (Rhodophyta), u které zástupci bazální skupiny (Cyanidales) obývají horké prameny s různou salinitou a chemickým složením. Tomu, že červená linie řas pravděpodobně pochází z extrémního prostředí, navíc nasvědčuje i to, že mají oproti ostatním volně žijícím řasovým skupinám značně redukovaný genom (Qiu et al. 2015). U zbývajících linie (Viridiplantae) však při hledání její bazální skupiny nastává problém. Během evoluce (před 1200 až 800 miliony let) se totiž rozdělila se na dvě hlavní linie: chlorofytní a streptofytní (Leliaert et al. 2012). Obě linie stejně jako zástupci jejich bazálních skupin však dominují v opačných prostředích. Chlorophyta v mořském a Streptophyta ve sladkovodním a terestrickém prostředí. Narozdíl od Glaucophyt a ruduch, které mají pravděpodobně původ v prostředí jiném než mořském, si tedy nelze domýšlet jaké z prostředí je pro Viridiplantae původní.

Vše tedy nasvědčuje tomu, že první fotosyntetizující eukaryota vznikla ve sladkovodním prostředí. Avšak i tato představa má svá slabá místa. Jeden z nejvýznamnějších protiargumentů předpokládá, že v době, do níž byla datována primární endosymbióza, chyběly stále sladkovodní biotopy či biologičtí vektorů schopní přenášet řasy nebo alespoň jejich spory mezi dočasnými sladkovodními stanovišti. Nejstarší známá jezera a řeky jako je například jezero Bajkal (staré 25 milionů let) či řeka Finke (stará 350 milionů let) jsou stále příliš mladé na to, aby v nich mohla tato událost proběhnout (Colman et al. 2003; Haines et al. 2001). S možným vysvětlením přišli Wellman and Strother (2015), kteří datovali za použití geochemických modelů vznik primární produkce v terestrických podmínkách již do období před 3 až 2,7 miliardami let, čímž připustili možnost, že již tehdy mohla existovat aeroterestrická biota zajišťující přesun prvních řas mezi efemerními sladkovodními stanovišti. Lze si také představit, že tyto organismy začaly hojně využívat nově vznikající sladkovodní prostředí jako útočiště před tehdy intenzivnějším UV zářením (Mulikdjanian et al. 2006). Tento přechod do nového

prostředí by také mohl být impulsem pro evoluční události, které vyústily v prudkou radiaci Archaeplastid.



**Obrázek 2:** Schematický fylogenetický strom znázorňující hypotézu společného původu Archaeplastid. Nalevo je vyobrazený předpokládaný „hostitelský“ předek, tedy fagotrofní eukaryot s dvěma bičíky, který zachytil fotosyntetizující sinici jako běžnou část své potravy. Následné buněčné a molekulární události daly vzniknout primárnímu plastidu, a tedy i domnělému předku všech Archaeplastid. Podle Jackson et al. (2015)

## 5 Adaptace na široký gradient salinity

Při přechodu do prostředí s rozdílnou salinitou je řasa okamžitě vystavena osmotickému stresu, který má přímý dopad na její buněčný vodní potenciál a následně také na narušení homeostáze iontů způsobené jejich nadbytečným přísunem či ztrátou (Kirst 1990). V reakci na tyto změny poté dochází k narušení mnohých metabolických procesů, což může postupně vést až k úmrtí organismu (Martins et al. 1999). Existují však adaptace umožňující řasám tyto náhlé změny v salinitě překonat, a dokonce v nových podmínkách nadále růst a dělit se. A právě tyto adaptace umožňující přežívání v širokém gradientu salinity se zdají být zásadní pro úspěšný přechod mezi slanými a sladkými vodami. Tyto euryhalinní organismy nám prostřednictvím adaptačních experimentů poskytují podstatné informace nejen o fungování a vzniku potřebných

adaptací, ale také pomáhají nastítnit mechanismy procesů, hrajících roli při přechodech mezi sladkovodním a mořským prostředím.

## 5.1 Genetická adaptace

Aby organismus přežil změnu salinity, musí nutně přizpůsobit svou fyziologii novým podmínkám. A má-li dojít k nezbytným fyziologickým změnám, musí nejprve dojít ke změnám genetickým. Tyto změny lze rozdělit na konstitutivní (ireverzibilní), při nichž dochází přímo ke změnám sekvence DNA a indukované (reverzibilní), u kterých dochází pouze k pozměnění genové exprese (Lachapelle et al. 2015).

### 5.1.1 Konstitutivní genetické změny

Mezi hlavní mechanismy, které dávají vzniknout konstitutivním genetickým změnám, patří především vytváření nových genetických kombinací při pohlavním rozmnožování a následné působení selekčního tlaku (Lachapelle et al. 2015). Selektivní tlak v nepříznivých podmínkách také působí na redukci již nepotřebných genů. Avšak díky ztrátám těchto přebytečných genů se o to více na výsledném fenotypu projevují nově získané výhodné geny či alelické kombinace (Foflonker et al. 2018). Odlišný mechanismus byl zjištěn u zelené řasy rodu *Picochlorum*, u které se potvrdil přenos genů zvyšujících toleranci proti salinitě od prokaryot pomocí horizontálního genového transferu (Foflonker et al. 2018). S dalším možným příkladem genetické adaptace přišla také studie Cabello-Yeves and Rodriguez-Valera (2019), která porovnávala složení proteomu u mořských a sladkovodních řasových linií. Na základě rozdílného přerozdělení izoelektrických bodů zjistila, že se složení aminokyselin mezi mořskými a sladkovodními druhy výrazně liší. Sladkovodní druhy mají proteom více acidický, což lze vysvětlit například menší dostupností sodíkových iontů ve sladkovodním prostředí. Tyto ireverzibilní genetické změny nejen rozšiřují rozsah tolerovaných hodnot salinity, ale také rozšiřují plasticitu transkriptomu, která je klíčová pro reverzibilní změny v genové expresi (Lachapelle et al. 2015).

### 5.1.2 Indukované genetické změny

Při indukovaných genetických změnách dochází k modifikacím proteomu bez změny samotné genetické informace. Tím je umožněno adaptivně odpovídat na změny podmínek přímo jedinci a umožňují tedy i přenos konstitutivní změny do dalších generací. Tyto změny v proteomu jsou u euryhalinních organismů schopné zajistit tolerování salinity mnohdy od hodnot sladké vody po mořskou (Dittami et al. 2012). Při adaptačních experimentech se navíc ukazuje, že některé z proběhlých přechodů jsou stále reverzibilní, jako je tomu například u přechodů rodů *Ectocarpus* a *Ulva* do sladkovodního prostředí (Dittami et al. 2012; Ichihara et al. 2011). U mořské a sladkovodní linie rodu *Ectocarpus* dokonce nebyla zjištěna rozdílná genová exprese

v mořském médiu (Dittami et al. 2012). Změny v expresích genů lze také rozlišit na krátkodobé, které odpovídají spíše na osmotický a iontový šok a dlouhodobé, které mají svůj vrchol exprese po 1 až 4 hodinách od vystavení rozdílné salinitě a následně se po lehkém a pomalém poklesu jejich zvýšená hodnota exprese ustálí (Ichihara et al. 2011). Právě přes tyto dlouhodobé koordinované genové regulace vede jedna z cest ke vzniku adaptací na stres způsobený zvýšenou salinitou (Foflonker et al. 2018).

## 5.2 Fyziologické adaptace

Jak už bylo zmíněno výše, genetické změny vedou k fyziologickým adaptacím. Tyto adaptace umožňují, aby byla po salinním šoku znovu obnovena osmotická a iontová rovnováha, činnost fotosyntézy, s ní související růst a další nezbytné biologické procesy.

### 5.2.1 Osmoregulace

Je více možností, jak znovu dosáhnou osmotické a iontové rovnováhy po změně salinity v okolním prostředí. Řasy nejčastěji využívají pulzující vakuoly, iontových transportérů nebo syntézy či degradace kompatibilních solutů.

Pulzující vakuola se nachází výhradně u sladkovodních protist (Cavalier-Smith 2009). Jejím účelem je pumpovat z organismu přebytečnou vodu a odpadní látky rozpustné ve vodě. Permeabilita její membrány je zajištěna aquaporiny a při změně osmotických podmínek se téměř nemění (Komsic-Buchmann et al. 2014). Při zvyšující osmotické síle média se však zkracuje interval jejich kontrakcí a roste také její celková velikost (Cronkite et al. 1991). Sladkovodní řasy tyto změny v aktivitě kontraktilní vakuoly využívají pro přizpůsobení se novým osmotickým podmínkám mnohem častěji než změny v cytosolické osmolaritě nebo propustnosti plazmatické membrány (Komsic-Buchmann et al. 2014).

Další z možností, jak znovu dosáhnout osmotické rovnováhy, je transport iontů skrze buněčnou membránu za pomoci molekulárních pump, transportérů a kanálů. Přičemž míra tolerance vůči salinitě je závislá především na způsobu regulace transportu iontů než na odlišnosti či zastoupení (Beilby 2015). Mezi hlavní ionty, které se zapojují do procesů osmoregulace, patří  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Cl^-$  a  $Ca^{2+}$  (Kirst 1990; Wegmann 1986). Poměry vnitrobuněčného zastoupení těchto iontů se v závislosti na salinitě obývaného habitatu značně liší. U mořských linií lze naměřit zvýšené vnitrobuněčné koncentrace  $Na^+$ , zatímco u sladkovodních jsou to především vyšší koncentrace  $K^+$ , ale také nitrátů, sulfátů, aminokyselin a amoniaku (Dittami et al. 2012). Změny koncentrací těchto iontů se mohou vlivem rozdílné salinity měnit i v buněčných kompartmentech jako jsou buněčná stěna, vakuola či cytoplasma (Mostaert et al. 1996)

Makrořasy mohou využívat i tzv. volného osmotického prostoru, který se nachází v těsné blízkosti jejich stélky. Během hypotonického šoku do něj vypustí ionty (především  $Cl^-$ ) a při



nastolení příznivých podmínek je znovu absorbuji (Gessner and Hammer 1968). Podobně může narůstat koncentrace amoniaku v okolí makrořas rostoucích v říčních deltách při nárazovém snížení salinity (Kamer and Fong 2000), avšak může jít jen o odpadní produkt při rozkladu řasy (Sfriso et al. 1987).

Vysoká vnitřní koncentrace  $K^+$  je u euryhalinních řas jako je *Ulva intestinalis* často nutná k udržení metabolické aktivity a málokdy kolísá (Ritchie and Larkum 1985). Koncentrace ostatních iontů se však během osmotických šoků výrazně mění což může vést k inhibici důležitých enzymů. Ve většině případů proto do hodiny po rychlém nárůstu jejich koncentrace přichází rychlý pokles a jejich osmoregulační funkci nahradí nově syntetizované kompatibilní soluty (Kirst 1990; Kakinuma et al. 2004).

Kompatibilní soluty jsou osmoticky aktivní nízkomolekulární sloučeniny, které i za vysokých koncentrací neovlivňují biochemické reakce v buňce (Wegmann 1986), přičemž některé mají pozitivní vliv i na stabilitu makromolekul (Kirst 1990). Díky jejich syntéze či degradaci může buňka upravovat svůj osmotický potenciál a vyrovnat se tak s osmotickým stresem.

Nejčastějšími kompatibilními soluty jsou polyoly mannitol, sorbitol, floridosid, isofloridosid, glycerol, dále pak prolin, různé betainy a sacharidy sacharóza, manóza či škrob. Ale i když jsou všechny vysoce rozpustné, může při vysokých hodnotách salinity dojít k jejich saturačnímu limitu. Kvůli takovýmto případům některé řasy využívají kombinace několika kompatibilních solutů (Kirst 1990) (viz. tabulka 1).

Z chemického hlediska se nejvíce kompatibilních solutů řadí mezi polyoly, které jsou bohaté na uhlík. Jejich koncentrace se obvykle zvyšuje společně s rostoucí salinitou média, což v závislosti na jejich složení ovlivňuje i následný poměr celkového uhlíku a dusíku v organismu. Zpravidla platí, že polyoly a sacharidy se hojněji vyskytují v mořských a halofilních liniích, zatímco aminokyseliny, amoniak a nitráty převládají v liniích sladkovodních (Dittami et al. 2012). Změnu celkového poměru těchto dvou prvků lze sledovat i při aklimatizaci na změnu salinity u euryhalinních řas (Reed 1985; Dittami et al. 2012). Obdobně se u řasy *Chlamydomonas reinhardtii* při nárůstu salinity zvýšila i exprese genů účastnících se metabolismu hlavních sacharidů jako je škrob, sacharóza a glukóza (Wang et al. 2018).

Existují ale i další látky, které se v řasách akumulují v závislosti na změnách salinity. Ve studii Ichihara et al. (2009) bylo zjištěno, že řasa *Ulva limnetica* ve sladkovodním prostředí produkuje mnohem více lectin-like proteinu než v mořském prostředí. Jeho přesná funkce je ale zatím neznámá. Spekuluje se, že by mohl vázat uhlohydrát působící jako kompatibilní solut a následně jej aglutinovat či přenášet do vakuoly a tím pomáhat v regulaci osmotického tlaku.

Další významnou látkou je dimethylsulfoniopropionát (DMSP) vyskytující se společně s dalšími kompatibilními soluty u mnoha mořských řas (Kirst 1990). Avšak DMSP se ve většině případů nepodílí na krátkodobém osmotickém přizpůsobení a jeho hladina se mění pouze s dlouhodobým osmotickým stresem (Edwardset al. 1988; Dickson et al. 1982). Najdou se ovšem i výjimky. U rozsivek žijících pod mořským ledem při studii Lyon et al. (2011) narostla hladina vnitrobuněčného DMSP o 85% již po 48 hodinách od změny podmínek ze salinních na hypersalinní. DMSP ovšem nemusí mít pouze funkci kompatibilního solutu, ale může sloužit také jako kryoprotektant, antioxidant a v neposlední řadě je to také důležitý prekurzor dimethylsulfidu (DMS) (Lyon et al. 2011; Burdett et al. 2015).

|                                      |                                |                                  |                    |
|--------------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|--------------------|
| <b>Rhodophyceae</b>                  |                                | <b>Prasinophyceae</b>            |                    |
| <i>Iridophycus flaccidum</i>         | Floridosid                     | <i>Asteromonas gracilis</i>      | Glycerol           |
| <i>Porphyridium purpureum</i>        | Prolin + další aminokyseliny   | <i>Platymonas suecica</i>        | Mannitol           |
| <i>Porphyra perforata</i>            | Floridosid + Isofloridosid     | <i>Platymonas subcordiformis</i> | Mannitol           |
| <i>Corallina officinalis</i>         | Floridosid + Isofloridosid     | <i>Pyramimonas sp.</i>           | Mannitol           |
| <i>Rhodymena foliifera</i>           | Floridosid + Isofloridosid     | <b>Bacillariophyceae</b>         |                    |
| <b>Chrysophyceae</b>                 |                                | <i>Cyclotella cryptica</i>       | Prolin + Glutamát  |
| <i>Poteroiochromonas danica</i>      | Isofloridosid                  | <i>C. meneghiniana</i>           | Prolin             |
| <i>Poteroiochromonas malhamensis</i> | Isofloridosid                  | <i>Navicula sp.</i>              | Prolin             |
| <i>Monochrysis lutheri</i>           | D(+)-1,4/2,5-Cyclohexanetetrol | <i>Phaeodactylum tricornutum</i> | Prolin             |
| <b>Eustigmatophyceae</b>             |                                | <i>Cylindrotheca fusiformis</i>  | Manóza             |
| <i>Monallantus salina</i>            | Mannitol + Prolin              | <b>Chlorophyceae</b>             |                    |
| <b>Phaeophyceae</b>                  |                                | <i>Dunaliella parva</i>          | Glycerol           |
| <i>Ascophyllum nodosum</i>           | Mannitol                       | <i>Dunaliella tertiolecta</i>    | Glycerol           |
| <i>Fucus serratus</i>                | Mannitol                       | <i>Dunaliella viridis</i>        | Glycerol           |
| <i>Fucus vesiculosus</i>             | Prolin + další aminokyseliny   | <i>Chlorella emersonii</i>       | Prolin + Sacharóza |
| <i>Pilayella littoralis</i>          | Mannitol                       | <i>Chlorella salina</i>          | Prolin             |
| <i>Colpomenia sinuosa</i>            | Mannitol                       | <i>Stichococcus bacillaris</i>   | Sorbitol + Prolin  |
| <i>Dictyota dichotoma</i>            | Mannitol                       | <i>Stichococcus chloranthus</i>  | Sorbitol + Prolin  |
| <i>Ecklonia radiata</i>              | Mannitol                       | <i>Chlamydomonas sp.</i>         | Glycerol           |

**Tabulka 1:** Částečný přehled organických kompatibilních solutů a jejich kombinací, které se vyskytují u různých řasových skupin. Podle Wegmann (1986)

### 5.2.2 Fotosyntetická aktivita

Změny salinity u řas podstatně ovlivňují také strukturu a funkci fotosyntetického aparátu, což ve většině případů vede ke snížení jejich fotosyntetické aktivity (Kirst 1990). Hlavním z důvodů je narušení buněčné homeostáze při osmotickém stresu, které vede k nadprodukcí kyslíkových radikálů (ROS) v chloroplastovém a mitochondriálním elektronovém transportu. ROS poté způsobují poškození lipidů, uhlohydrátů, bílkovin a DNA, což nakonec vede k oxidačnímu stresu nebo případně programované buněčné smrti, apoptóze (Perrineau et al. 2014). Aby se zamezilo toxicitě ROS, vyvinuly řasy a rostliny obranné systémy tvořené neenzymatickými a enzymatickými složkami. Hlavními neenzymatickými složkami jsou ve vodě rozpustný glutathion a askorbáty a ve vodě nerozpustné karotenoidy a  $\alpha$ -tokoferol. Mezi enzymy jde především o superoxid dismutázu, která převádí  $O_2^-$  na  $H_2O_2$ , který je následně odstraněn askorbátovou peroxidázou a glutathion reduktázou v glutathion-askorbátovém cyklu (Noctor and Foyer 1998). Dokládá to například studie Singh et al. (2018) s řasami *Chlorococcum humicola* a *Chlorella vulgaris*, u kterých se aktivita všech zmíněných antioxidačních enzymů zvyšovala společně s rostoucí koncentrací salinity média. Podobně tomu bylo i u řasy *Ulva limnetica*, u které se po přesunu do sladkovodního prostředí zvýšila aktivita genu pro chloroplastovou askorbát peroxidázu (Ichihara et al. 2011). Existují ovšem i další způsoby obrany před oxidačním stresem. Studie Li et al. (2008) provedená na řase *Haematococcus pluvialis* například ukázala, že řasa eliminuje vznik ROS zvýšenou biosyntézou sekundárního karotenoidu astaxanthinu a to díky spotřebě velkého množství molekulárního kyslíku.

Při změnách salinity dochází také ke změnám ve struktuře fotosyntetického aparátu. Tyto změny ve struktuře se týkají převážně fotosyntetického komplexu II (PSII), který se ukazuje jako nejnáchylnější na kolísání salinity prostředí (Xia et al. 2004). Při zvýšené salinitě disociují od thylakoidní membrány proteiny komplexu produkujícího kyslík (Murata and Miyao 1985) a snižují se počty aktivních reakčních center (Xia et al. 2004). U některých druhů dochází i ke zvětšení efektivní velikosti světlosběrných antén, což vytváří vyšší excitační tlak (Demetriou et al. 2007). Ve studii Demetriou et al. (2007) se ukázalo, že řasa *Desmodesmus communis* při zvýšené salinitě umí tyto změny kompenzovat exogenně získanými polyaminy jako je například putrescin. V buňkách také často dochází k řízenému poklesu činnosti enzymu superoxid dismutázy, který převádí  $O_2^-$  na  $H_2O_2$ , čímž zamezuje tvorbě ROS. To má pak za následek poškození světlosběrných komplexů u fotosystému I (Subramanyam et al. 2010). Toto utlumení přenosu elektronů na více místech pravděpodobně brání zničení reakčních center tím, že rozloží působení ROS na celý fotosyntetický aparát (Satoh et al. 1983).

### 5.2.3 Pohlavní rozmnožování

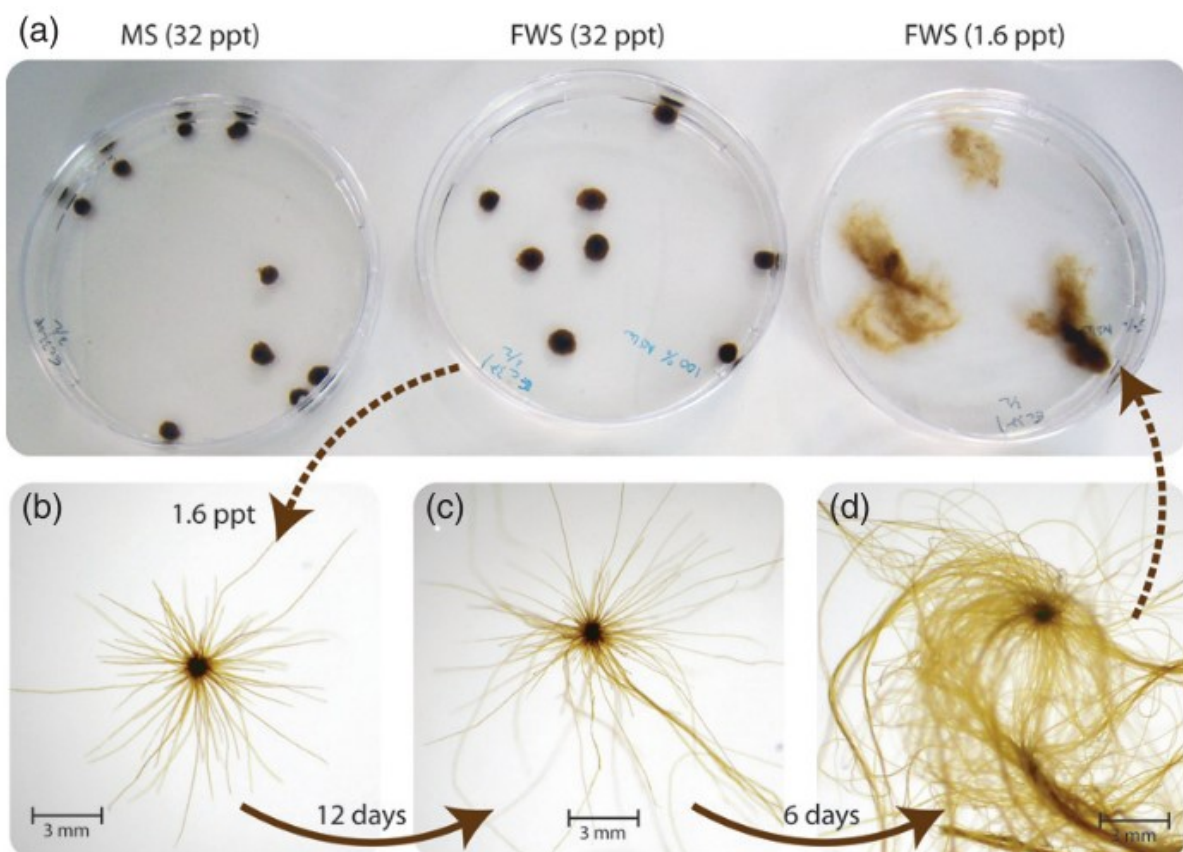
Enviromentální stres, a tedy i zvýšená salinita, u řas v mnoha případech spouští proces pohlavního rozmnožování a následnou tvorbu rezistentních stádií zygot (Frenkel et al. 2014). Snížení salinity však procesu pohlavního rozmnožování spíše zamezuje. Jeden z důvodů, proč tomu tak je, může být zamezení fúze gamet, která je u mořských druhů řas vysoce citlivá na osmotické podmínky. Další z důvodů mohou být mechanismy blokování vzniku polyspermie, které se u mořských druhů spoléhají na přísun  $\text{Na}^+$ , zatímco u sladkovodních druhů fungují na principu odtoku  $\text{Cl}^-$ . Proto se u mnoha druhů řas, které prošly přechodem do prostředí s nižší salinitou, pohlavní rozmnožování vůbec nevyskytuje. Příkladem může být baltická populace chaluhy *Fucus vesiculosus* (Tatarenkov et al. 2005) či ruducha *Bangia atropurpurea* rostoucí v severoamerických Velkých jezerech (Sheath and Cole 1980). Avšak narozdíl od *F. vesiculosus* bylo u *B. atropurpurea* pohlavní rozmnožování zaznamenáno alespoň v laboratorních podmínkách (Gargiulo et al. 2001). Podobné inhibiční účinky byly pozorovány i u tetrasporofytu euryhalinní ruduchy *Heterosiphonia japonica*, který běžně produkuje tetraspory při salinitě 30 psu, avšak při nižší salinitě než 20 psu (včetně) žádné neprodukoval a současně se u něj zvýšila fragmentace stélky (Bjærke and Rueness 2004). Obdobně byla při snížené salinitě pozastavena tvorba plurilokulárních sporangií a uvolňování mikrospor u sladkovodních liniích rodu *Ectocarpus* (Dittami et al. 2012). U bentické rozsivky *Ardissonea crystallina* vyskytující se v Černém moři se dokonce zvýšená salinita blíží se mořské koncentraci ukázala pro její pohlavní rozmnožování příznivější než ta, v které se aktuálně vyskytuje (Davidovich et al. 2016). Lze tedy usuzovat, že mnoho řas, které prošly přechody, ještě není plně adaptováno na nové prostředí a právě procesy spojené s pohlavním rozmnožováním nám při studiu adaptací na sladkovodní prostředí můžou poskytnout spoustu důležitých informací (Raven 1999).

### 5.3 Morfologické adaptace

Zvýšení či snížení salinity se často odráží i v samotné morfologii euryhalinních druhů řas. Například u zelené řasy *Dunaliella salina* vede zvýšená salinita ke zvětšení objemu buněk (Fu et al. 2014), zatímco u brakických makrořas zas snížená salinita působí redukci jejich velikosti společně s výraznými změnami v jejich morfologii (Kalvas and Kautsky 1998). Vliv osmotického tlaku na morfologii organismu byl také často studován na rozsivkách rodu *Skeletonema*. U těchto euryhalinních rozsivek způsobuje změna salinity prodlužování buněk, odlišný tvar valv či změnu vzdálenosti mezi přilehlými buňkami a průměrného počtu buněk ve vláknu (Paasche et al. 1975; Balzano et al. 2011). A ačkoliv se všechny tyto morfologické modifikace zdají být nezávislé na růstové rychlosti, jejich adaptivní význam je zatím předmětem diskuzí (Paasche et al. 1975).

### 5.3.1 Sulfatované polysacharidy v buněčné stěně

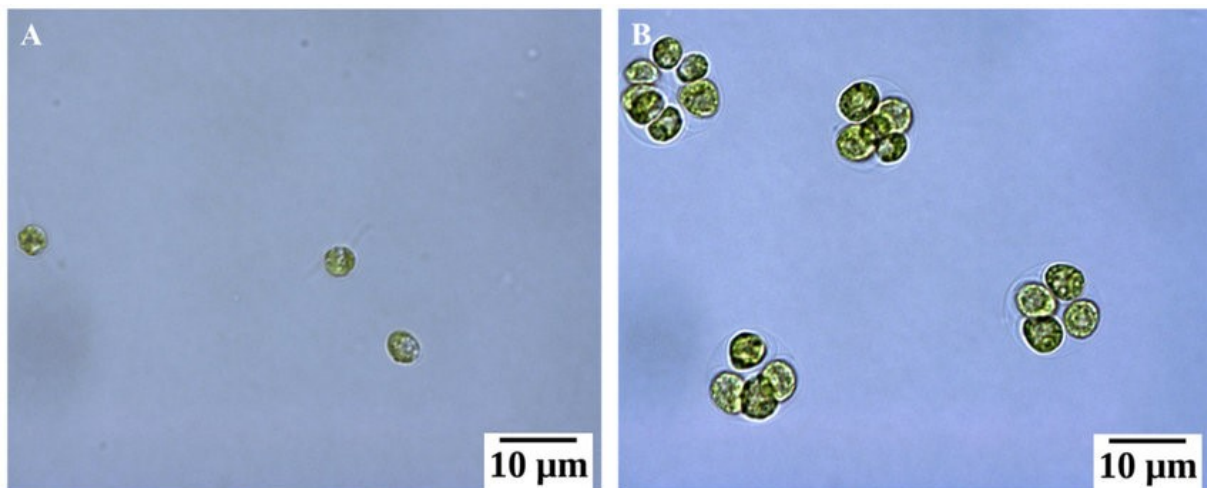
Pozměněnou morfologii v závislosti na rozdílné salinitě zaznamenali i Dittami et al. (2012), při porovnávání sladkovodních a mořských linií chaluhy rodu *Ectocarpus*. Sladkovodní linie, na rozdíl od těch mořských, vytvářely ve sladké vodě dlouhá a lepkavá filamenta (viz. obrázek 3). Tyto změny doprovázela i rozdílná genová exprese v genech pro sulfotransferázy a sulfatázy, tedy enzymy zapojené do sulfatace a desulfatace sacharidů v buněčné stěně. Tyto sulfatované polysacharidy se vyskytují jako hlavní složka extracelulární matrix u všech mořských řas i vyšších rostlin bez ohledu na jejich fylogenetickou pozici, zatímco sladkovodní a suchozemští zástupci je vůbec neprodukují (Popper et al. 2011). Lze tedy předpokládat, že sulfatované sacharidy buněčné stěny poskytují přes osmotické či pozorované strukturální funkce mořským organismům jisté adaptivní výhody (Kloareg and Quatrano 1988). Přerušení jejich syntézy ve sladké vodě zas u zmíněné sladkovodní linie rodu *Ectocarpus* umožní tvorbu dlouhých a lepkavých filament, které brání v unášení řasy proudem (Dittami et al. 2012).



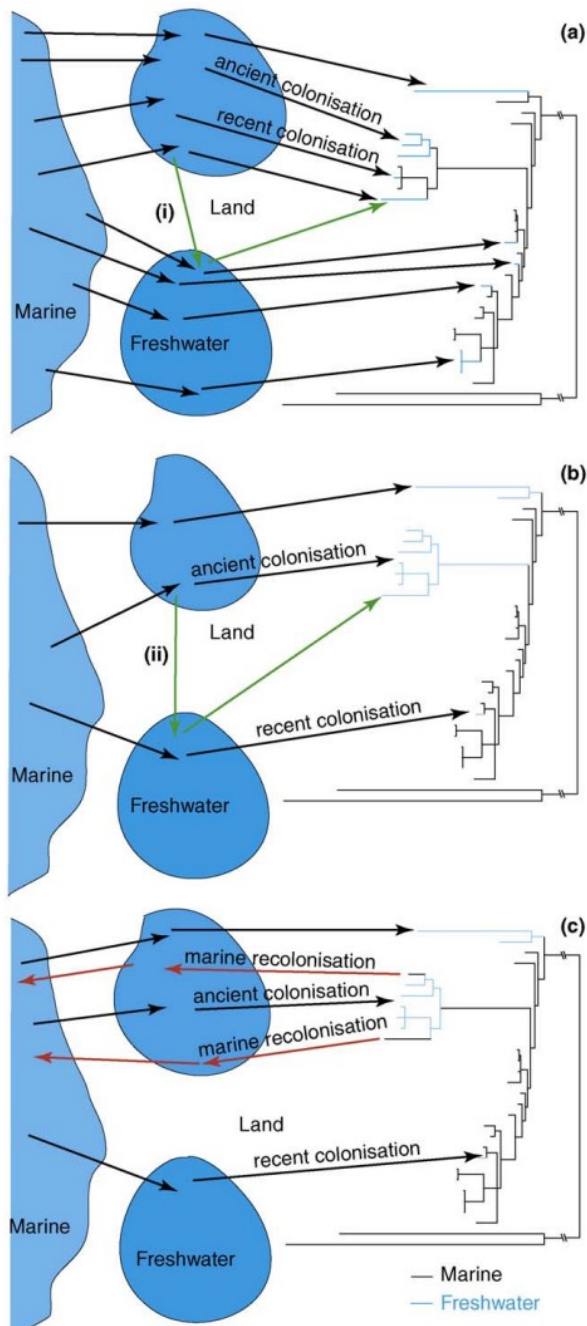
**Obrázek 3:** Morfologické změny sladkovodní (FWS) a mořské (MS) linie řasy rodu *Ectocarpus* v médiích s různou salinitou. V části (a) lze pozorovat morfologii MS v médiu se salinitou 32 ppt a FWS v médiu se salinitou 32 ppt a 1,6 ppt (zleva doprava). Části (b - d) ukazují změny morfologie FWS po přímém přenosu z média se salinitou 32 ppt do média se salinitou 1,6 ppt. Změny jsou zaznamenány ihned (b), po 12 dnech (c) a po 18 dnech (d) od přenosu. Podle Dittami et al. (2012)

### 5.3.2 Palmelloidní stádia u zelených řas

U zelených euryhalinních řas *Chlamydomonas reinhardtii* a *Dunaliella salina* je adaptace na nepříznivé osmotické podmínky často spojena s vytvořením palmelloidního stádia. Buňky při vstupu do tohoto stádia ztrácí bičíky, zesílí svou buněčnou stěnu a produkují zvýšené množství exopolysacharidů (EPS). Následně po rozdělení buněk zůstávají ve shlucích ve společné mateřské buněčné stěně a matrix z ESP (Shetty et al. 2019). Z Oklahomských Velkých solných plání Buchheim et al. (2010) dokonce izolovali linii z rodu *Dunaliella*, která ve svém palmelloidním stádiu dokáže růst v hypersalinních podmínkách stejně dobře jako ve sladké vodě. Podobná palmelloidní stádia využívá k přežití v extrémních podmínkách i *Dunaliella atacamensis* rostoucí na pavučinách u vchodu do pobřežní jeskyně na poušti Atacama (Azúa-Bustos et al. 2010). Tato palmelloidní stádia mohou taktéž sloužit i jako adaptace proti herbivorii (Lurling and Beekman 2006) či jako odrazový můstek pro evoluci mnohobuněčných druhů (Khona et al. 2016).



**Obrázek 4:** *Chlamydomonas reinhardtii* kultivován při běžných podmínkách (a) a při zvýšené salinitě média (150 mM NaCl), která vyvolala tvorbu palmelloidních stádií (b). Podle Shetty et al. (2019).



**Obrázek 5:** Tři zjednodušené příklady fylogenetických stromů, které demonstrují, jak za pomoci znalostí fylogenetických vztahů mořských a sladkovodních linií lze odvodit scénáře přechodů mezi těmito prostředími. První příklad (a) demonstruje rozložení linií, které naznačuje časté přechody mezi mořem a sladkou vodou. Naopak na druhém fylogenetickém stromu (b) jsou linie ze stejných prostředí často v monofyletických skupinách, což ukazuje na pouze výjimečné přechody. Na posledním příkladu (c) lze vidět mořskou linii vnořenou mezi sladkovodní druhy, z čehož je zřejmé, že proběhla zpětná kolonizace mořského prostředí. Podle Logares et al. (2009).

## 6 Scénáře přechodů

Díky stále exaktnějším metodám molekulární fylogeneze a neustálému popisování nových druhů můžeme sestavovat čím dál tím přesnější a obsáhlejší fylogenetické stromy. Pokud se při pohledu na ně zaměříme na různé rozmístění námi popsanych sladkovodních a mořských druhů, dokážeme následně odhadnout frekvenci, načasování, ale i směry, ve kterých docházelo k přechodům mezi těmito prostředími. Na schématu podle Logares et al. (2009) jsou nastíněné tři základní scénáře, které mohou v důsledku úspěšné kolonizace nového prostředí nastat. Černé větve na schématech vždy znázorňují mořské a modré zas sladkovodní linie. Zelené šipky poté disperzi mezi sladkovodními tělesy, čímž vysvětlují následný výskyt druhů na více stanovištích. Tyto scénáře ovšem neberou v potaz další kolonizační cesty jako je například izolace kmenů ve vodních útvarech, u kterých se razantně změnila salinita.

Na prvním příkladu (a) lze vidět na fylogenetickém stromu mořské a sladkovodní druhy hojně promíchané, bez toho, aby tvořily v závislosti na obývaném prostředí větší společné monofyletické shluky. Lze tedy soudit, že u studované linie docházelo k přechodům mezi mořem a sladkou vodou paralelně a relativně často.



Naopak na druhém fylogenetickém stromu (b) je jen nepatrné množství blízce příbuzných druhů, které by obývaly rozdílné prostředí. V tomto případě mají sladkovodní a mořské druhy tendenci shlukovat se do monofyletických skupin, což naznačuje jediný úspěšný přechod mezi těmito prostředími a následnou diverzifikaci.

Na posledním příkladu (c) lze pozorovat sladkovodní linii, která po vzoru předchozích příkladů, svým vnořením mezi mořské linie poukazuje na přechod z moře do sladké vody. Sama ovšem kromě sladkovodních druhů obsahuje i druhy mořské. V tomto případě jde pravděpodobně o zpětnou kolonizaci mořského prostředí těmito druhy. Je tedy zjevné, že pokud známe potřebné fylogenetické vztahy a prostředí, v kterém se dané druhy vyskytují, není složité určit směr, ve kterém přechody mezi prostředími probíhaly.

## 7 Přechody mezi mořským a sladkovodním prostředím u chrysofyt

Novodobé studie zabývající se molekulární fylogenetikou protist často odкрývají mnoho zajímavých dat o vztazích sladkovodních a mořských linií, nicméně jen zřídka kdy se zabývají přechody mezi těmito prostředími. Jednou z protistních skupin vhodnou na zkoumání přechodů mezi mořem a sladkými vodami jsou Chrysofyta. Jedná se totiž o relativně prozkoumanou linii s rozšířením jak ve sladkovodních, tak i mořských biotopech a zahrnuje také euryhalinní zástupce jako jsou hojně studované druhy rodu *Paraphysomonas*.

### 7.1 Obecná charakteristika chrysofyt

Chrysofyta jsou jednobuněčné či koloniální řasy vyznačující se svými heterokontními bičíky, endogenně silifikovanými stomatocystami a plastidy obsahujícími chlorofyl *a*, *c* a fukoxanthin. Povrch jejich buněk kryje periplast, který může být překryt lorikou či druhově specifickými křemičitými šupinami. Patří mezi fotosyntetizující Stramenopila (Ochrophyta), která získala plastid ruduchového původu seriální endosymbiózou. Existují však i mixotrofní či dokonce heterotrofní linie, u kterých došlo k sekundární ztrátě plastidu. Tradičně je centrum jejich diverzity umístováno do temperátních sladkých vod, kde se vyskytují nejčastěji jako součást jarního a podzimního fytoplanktonu. K nalezení jsou ale i na mnohem neobvyklejších místech jako například v půdě, na tajícím sněhu či v organických shlucích „mořského sněhu“ (Remias et al. 2020).

Vznik chrysofyt datují Brown a Sorhannus (2010) na základě diverzifikace Stramenopil někam do období Permu (před ~ 279 miliony let) a ačkoliv mezi popsányými druhy převažují ty sladkovodní, jejich původním prostředím je pravděpodobně moře. Lze tak usuzovat



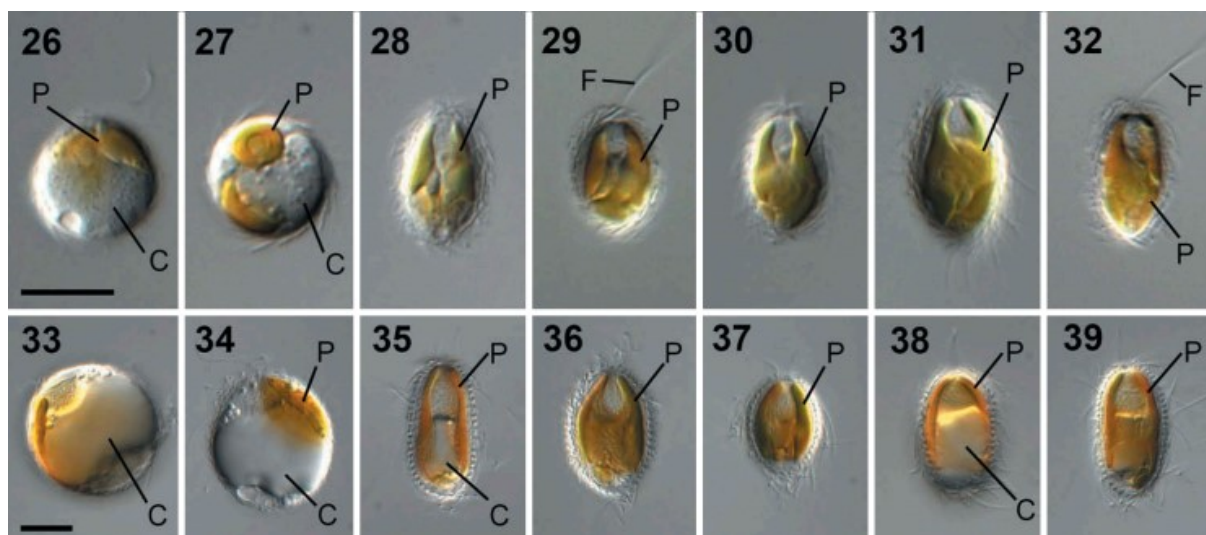
z paleontologického záznamu, který se nám díky tvorbě křemičitých stomatocyst a šupin dochoval. Nejstarší chrysofytní stomatocysty jsou datované do konce spodní křídly a pochází z Jižního oceánu (Riaux-Gobin and Stumm 2006). Obdobně pochází z mořských lokalit i většina zbylých nálezů. Společně tak s bazálním postavením částečně mořské skupiny Paraphysomonadida poukazují na pravděpodobný mořský původ chrysofyt (Tappan 1980).

## 7.2 Mořská chrysofyta

V minulosti byla chrysofyta brána jako podstatná složka mořského planktonu. Avšak postupem času se většina významných mořských taxonů začala přemísťovat do samotných tříd jako Phaeothamniophyceae, Dictyochophyceae, Pelagophyceae či Bolidophyceae a popsáných mořských druhů spadajících do chrysofyt prudce ubylo. Nicméně fylogenetická analýza provedená týmem del Campo a Massana (2011) ukázala, že druhová diverzita chrysofyt v moři je mnohem výraznější. Po prohledání veřejných databází bylo nalezeno celkem 144 nových 18S rDNA sekvencí, které patří mořským chrysofytům. Po začlenění sekvencí do fylogenetického stromu přibyly čtyři nové klady, z nichž dva obsahují čistě mořské sekvence a jen 4 z celkem 12 chrysofytních kladů jsou čistě sladkovodní.

Jedním z nich byl i klad A (Synurales), u kterého byly donedávna známé pouze sladkovodní druhy s výjimkou několika málo brakických (Němcová et al. 2016). Situace se ovšem změnila, když se týmu Jeong et al. (2019) podařilo v korejském zálivu izolovat dva mořské druhy rodu *Mallomonas*. Jde o *M. marina* a *M. cuspis*, jejichž vzájemná poloha na fylogenetickém stromě naznačuje, že pravděpodobně každý z nich provedl samostatný přechod do moře. Během adaptačních experimentů se ukázala jako optimální hodnota salinity pro růst 20 psu, což dokazuje, že oba druhy jsou již adaptované na mořské prostředí. U obou druhů se také při salinitě nižší než 5 psu (včetně) změnil tvar buněk z protáhlého na kulovitý, zvětšila se chrysolaminaranová vakuola a plastid se přemístil do periferní oblasti buňky. Toto zvětšení zásobní vakuoly také ovlivnilo morfologii plastidu a mohlo mít dopad i na ostatní orgány. Při salinitě 5 psu a nižší buňky také ztratily schopnost růst, což společně ukazuje, že jde o mořské druhy se širokou valencí vůči salinitě.

Při pohledu na nynější fylogenetický strom chrysofyt nacházíme jen velmi málo kladů, které jsou čistě sladkovodní nebo mořské. Obdobně lze také pozorovat velký počet blízké příbuzných linií, kdy jedna je mořská a druhá naopak sladkovodní, jako je tomu například u nově popsáných mořských zástupců rodu *Mallomonas* (Jeong et al. 2019). Můžeme se tedy domnívat, že u chrysofyt došlo po dávném přechodu do sladké vody k enormní diverzifikaci, po které průběžně a relativně často dochází ke zpětné rekolonizaci moře.



**Obrázek 6:** *Mallomonas cuspis* (26-32) a *Mallomonas marina* (33-39) pořízené pod světelným mikroskopem vždy po 7 dnech od přesunutí do média s danou salinitou. Měřítko na snímcích znázorňuje 10 $\mu$ m a zkratky označují plastid (P), chrysolaminaranovou vakuolu (C) a bičík (F). Hodnoty salinity média rostou v každém řádku zleva doprava v pořadí 0,5,10,15,20,25 a 30 psu. Při salinitě 0 psu (26,33) a 5 psu (27,34) lze u obou druhů sledovat kulovitý tvar buněk společně se zvětšenou chrysolaminaranovou vakuolou (C) a periferním plastidem (P). Podle Jeong et al. (2019).

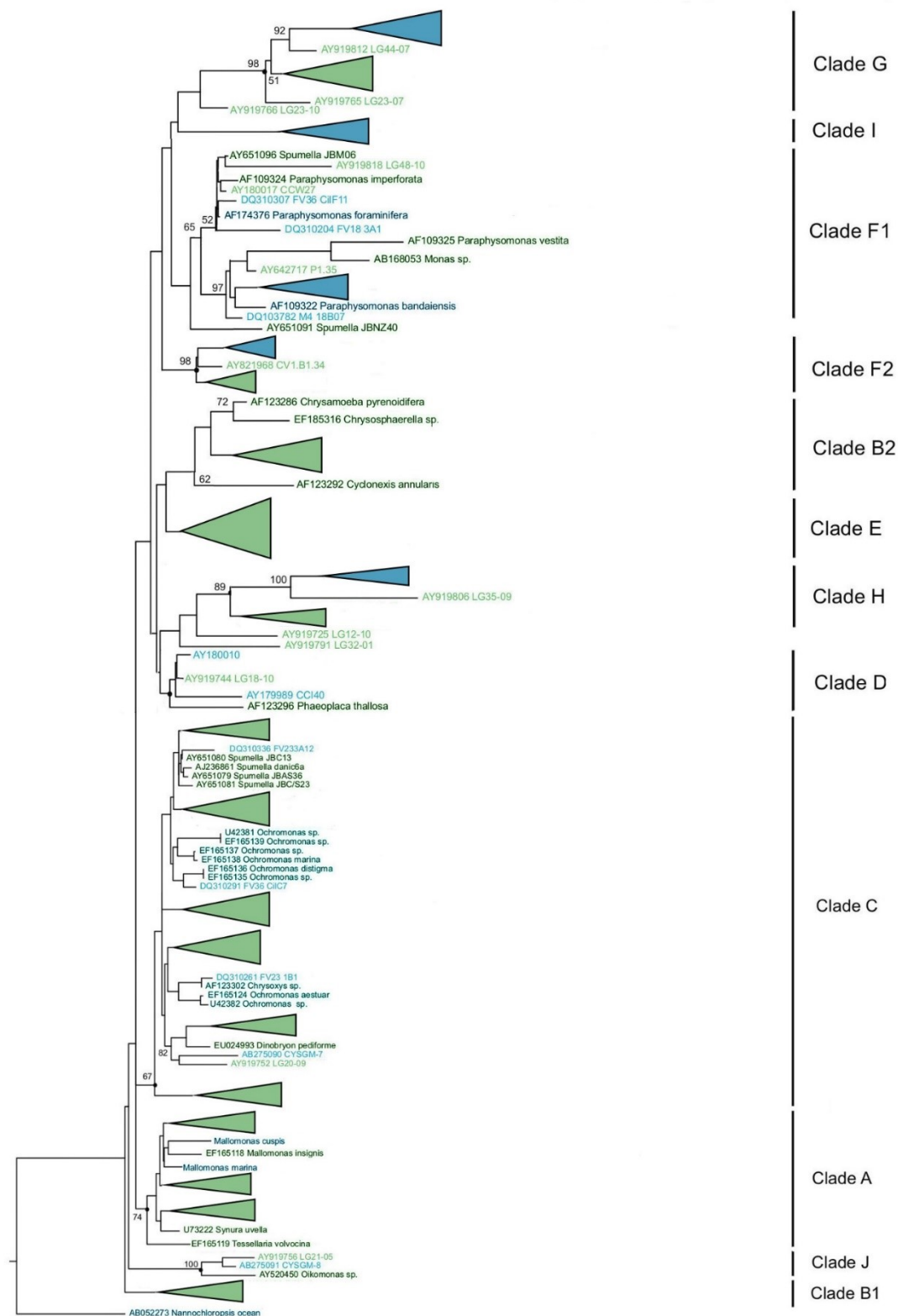
### 7.3 Hypotéza překročení Rubikonu

Přechody mezi mořským a sladkovodním prostředím jsou natolik významné evoluční události, že Mann (1999) ve své práci dokonce přirovnal přechod rozsivek do sladkovodního prostředí k přechodu vojsk Césarovy armády přes řeku Rubikon. Vedlo ho k tomu hned několik podobností, které spojují tyto události. Mann (1999) se domníval, že bariéra mezi mořem a sladkou vodou je jednosměrná a připouští pouze vzácné a nevratné přechody výhradně ve směru z moře do sladkých vod, které vedou k mohutné diverzifikaci. Této představě vcelku odpovídá evoluční historie obrněnek nastíněná týmem Logares et al. (2007). Přechody obrněnek do sladké vody proběhly z většiny již velmi dávno a to nejspíše při mezozoickém a kenozoickém zvedání hladiny oceánu a byly následované mohutnou diverzifikací sladkovodních linií, přičemž při fylogenetické analýze nebyla pozorována žádná zpětná kolonizace moře (Haq et al. 1987; Logares et al. 2007). Sladkovodní linie se tedy shlukují do monofyletických skupin a nejsou si s mořskými liniemi obrněnek blízké příbuzné. Je ovšem nutné brát v úvahu, že při fylogenetické analýze obrněnek zatím nebyly začleněny enviromentální sekvence.

Od této představy se ovšem začíná upouštět. Fylogenetické analýzy zahrnující nově získané enviromentální sekvence, provedené na několika protistních skupinách ukazují, že bariéra mezi slanou a sladkou vodou umožňuje přechody v obou směrech. U některých protistních skupin jsou navíc tyto přechody relativně časté. Dokonce i u některých linií rozsivek, při jejichž zkoumání tato hypotéza vznikla, se ukazuje, že přechody mezi mořem a sladkou vodou jsou častější než se dříve myslelo (Alverson et al. 2007). V neposlední řadě tuto představu vyvrací

svou pozicí na fylogenetickém stromě i mořské druhy chrysofyt, nevyjímaje dva nově popsané mořské druhy rodu *Mallomonas* (Jeong et al. 2019). U chrysofyt navíc můžeme sledovat linie, které učinily přechod přes onu bariérou i v opačném směru a zpětně tak kolonizovaly moře.

Stále ovšem musíme brát v potaz, že přechody mezi sladkou a slanou vodou podstatně ovlivňují míru speciace. Zpravidla můžeme u linií, které mají své zástupce napříč gradientem salinity, pozorovat, že jejich mladší a odvozené sladkovodní větve jsou na rozdíl od těch mořských druhově bohatší. Lze tedy usuzovat, že sladkovodní linie se diverzifikují rychleji než ty mořské, přičemž důvodem nejspíše bude celkově větší variabilita a výkyvy sladkovodního prostředí (Nakov et al. 2019).



Upraveno podle Campo and Massana (2011)

**Obrázek 7:** Zjednodušený fylogenetický strom chrysofyt. Zelenou barvou (●) jsou zvýrazněné sekvence, druhy, či sloučené linie, které byly izolovány ze sladkovodního či terestrického prostředí. Modrou barvou (●) jsou naopak zvýrazněné ty co byly izolovány z mořského prostředí. V upraveném fylogenetickém stromu lze poté přehledněji sledovat historii přechodů mezi těmito prostředími a snadno například určit linie, které zpětně kolonizovaly moře. Upraveno podle Campo and Massana (2011).

## Závěr

Mořské a sladkovodní prostředí se od sebe svými podmínkami pro život liší natolik, že mezi sebou vytváří jednu z nejhůře zdolatelných přírodních bariér. Problémy spojené s přechodem mezi těmito prostředími týkající se především osmoregulace, sdílí vodní organismy napříč fylogenetickým systémem a ani řasy nejsou výjimkou. Avšak i přes rozdíly, které mezi těmito prostředími panují, existují euryhalinní druhy, které jsou díky svým unikátním adaptacím schopné žít ve škálách salinity, které u některých druhů pokrývají hodnoty od sladké až po mořskou vodu. Právě tyto adaptace na široký gradient salinity jsou zřejmě klíčové při přechodech mezi sladkou a slanou vodou a euryhalinní druhy se tedy zdají být jakýmsi mezistupněm probíhajícího přechodu. Dokládají to mnohá data získaná prostřednictvím adaptačních experimentů, při kterých se porovnávala genová exprese, tvorba pohlavních struktur či morfologie mezi euryhalinními druhy a jejich nejbližšími mořskými či sladkovodními příbuznými.

Při zjišťování frekvence, načasování či směru, v jakých docházelo k přechodům mezi sladkovodním a mořským prostředím, je nejvíce nápomocná molekulární fylogenetická analýza, díky které lze sestavit fylogenetické stromy, na kterých jsou patrné historie přechodů daných linií. Ve své bakalářské práci jsem se takto zaměřil na chrysofyta, využil jsem recentně publikovanou fylogenezi chrysofyt, která kromě kultivovaných kmenů obsahuje i enviromentální sekvence (del Campo and Massana 2011). Ukázalo se, že u chrysofyt došlo pravděpodobně k dávnému přechodu z moře do sladkovodního prostředí, který vyvolal mohutnou diferenciaci druhů. Avšak k dalším přechodům docházelo průběžně, a navíc i relativně často. Při pohledu na fylogenetický strom lze pozorovat i početné zpětné kolonizace moře. Chrysofyta se tedy zdají být vhodnou modelovou skupinou ke studiu přechodů mezi mořem a sladkou vodou, u které se navíc prostřednictvím enviromentálního sekvenování průběžně zjišťuje dosud nepopsaná mořská druhová diverzita.

## Bibliografické citace

- Alverson, Andrew J., Robert K. Jansen, and Edward C. Theriot. 2007. "Bridging the Rubicon: Phylogenetic Analysis Reveals Repeated Colonizations of Marine and Fresh Waters by Thalassiosiroid Diatoms." *Molecular Phylogenetics and Evolution* 45 (1): 193–210. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2007.03.024>.
- Archibald, John M. 2009. "The Puzzle of Plastid Evolution." *Current Biology* 19 (2): R81–88. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.11.067>.
- Azúa-Bustos, A., C. González-Silva, L. Salas, R. E. Palma, and R. Vicuña. 2010. "A Novel Subaerial *Dunaliella* Species Growing on Cave Spiderwebs in the Atacama Desert." *Extremophiles* 14 (5): 443–52. <https://doi.org/10.1007/s00792-010-0322-7>.
- Balzano, Sergio, Diana Sarno, and Wiebe H.C.F. Kooistra. 2011. "Effects of Salinity on the Growth Rate and Morphology of Ten *Skeletonema* Strains." *Journal of Plankton Research* 33 (6): 937–45. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbq150>.
- Beilby, Mary J. 2015. "Salt Tolerance at Single Cell Level in Giant-Celled Characeae." *Frontiers in Plant Science* 6 (APR): 1–16. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00226>.
- Bjærke, Marit Ruge, and Jan Rueness. 2004. "Effects of Temperature and Salinity on Growth, Reproduction and Survival in the Introduced Red Alga *Heterosiphonia Japonica* (Ceramiiales, Rhodophyta)." *Botanica Marina* 47 (5): 373–80. <https://doi.org/10.1515/BOT.2004.055>.
- Blank, Carrine E. 2013. "Phylogenetic Distribution of Compatible Solute Synthesis Genes Support a Freshwater Origin for Cyanobacteria." *Journal of Phycology* 49 (5): 880–95. <https://doi.org/10.1111/jpy.12098>.
- Bouvier, Thierry C. 2002. "Two Temperate Estuaries." *Distribution* 47 (2): 453–70.
- Brown, Joseph W., and Ulf Sorhannus. 2010. "A Molecular Genetic Timescale for the Diversification of Autotrophic Stramenopiles (Ochrophyta): Substantive Underestimation of Putative Fossil Ages." *PLoS ONE* 5 (9): 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012759>.
- Buchheim, Mark A., Andrea E. Kirkwood, Julie A. Buchheim, Bindhu Verghese, and William J. Henley. 2010. "Hypersaline Soil Supports a Diverse Community of *Dunaliella* (Chlorophyceae)." *Journal of Phycology* 46 (5): 1038–47. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2010.00886.x>.
- Burdett, Heidi L., Angela D. Hatton, and Nicholas A. Kamenos. 2015. "Effects of Reduced Salinity on the Photosynthetic Characteristics and Intracellular DMSP Concentrations of the Red Coralline Alga, *Lithothamnion Glaciale*." *Marine Biology* 162 (5): 1077–85. <https://doi.org/10.1007/s00227-015-2650-8>.
- Cabello-Yeves, Pedro J., and Francisco Rodriguez-Valera. 2019. "Marine-Freshwater Prokaryotic Transitions Require Extensive Changes in the Predicted Proteome." *Microbiome* 7 (1): 1–12. <https://doi.org/10.1186/s40168-019-0731-5>.
- Campo, Javier del, and Ramon Massana. 2011. "Emerging Diversity within Chrysophytes, Choanoflagellates and Bicosoecids Based on Molecular Surveys." *Protist* 162 (3): 435–48. <https://doi.org/10.1016/j.protis.2010.10.003>.
- Cavalier-Smith, Thomas. 2009. "Megaphylogeny, Cell Body Plans, Adaptive Zones: Causes and Timing of Eukaryote Basal Radiations." *Journal of Eukaryotic Microbiology* 56 (1): 26–33. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2008.00373.x>.
- Cho, J. C., and J. M. Tiedje. 2000. "Biogeography and Degree of Endemicity of Fluorescent *Pseudomonas* Strains in Soil." *Applied and Environmental Microbiology* 66 (12): 5448–56. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.12.5448-5456.2000>.

- Coci, Manuela, Daniela Riechmann, Paul L.E. Bodelier, Stefania Stefani, Gabriel Zwart, and Hendrikus J. Laanbroek. 2005. "Effect of Salinity on Temporal and Spatial Dynamics of Ammonia-Oxidising Bacteria from Intertidal Freshwater Sediment." *FEMS Microbiology Ecology* 53 (3): 359–68. <https://doi.org/10.1016/j.femsec.2005.01.016>.
- Colman, S.M., E.B. Karabanov, and C.H. Nelson. 2003. "Quaternary Sedimentation and Subsidence History of Lake Baikal, Siberia, Based on Seismic Stratigraphy and Coring." *Journal of Sedimentary Research* 73 (6): 941–56. <https://doi.org/10.1306/041703730941>.
- Cronkite, Donald L, Donna Neuman, Jody Walker, and Sidney K Pierce. 1991. "The Response of Contractile and Non-Contractile Vacuoles of Paramecium Calkinsi to Widely Varying Salinities." *The Journal of Protozoology* 38 (6): 565–73. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1991.tb06081.x>.
- Crump, Byron C, Charles S Hopkinson, Mitchell L Sogin, and John E Hobbie. 2004. "Microbial Biogeography along an Estuarine Salinity Gradient." *Applied and Environmental Microbiology* 70 (3): 1494–1505. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.3.1494>.
- Dagan, Tal, Mayo Roettger, Karina Stucken, Giddy Landan, Robin Koch, Peter Major, Sven B Gould, et al. 2013. "Genomes of Stigonematalean Cyanobacteria (Subsection V) and the Evolution of Oxygenic Photosynthesis from Prokaryotes to Plastids." *Genome Biology and Evolution* 5 (1): 31–44. <https://doi.org/10.1093/gbe/evs117>.
- Davidovich, O. I., N. A. Davidovich, Yu A. Podunay, K. I. Shorenko, and A. Witkowski. 2016. "Effect of Salinity on Vegetative Growth and Sexual Reproduction of Algae from the Genus Ardissona de Notaris (Bacillariophyta)." *Russian Journal of Plant Physiology* 63 (6): 776–82. <https://doi.org/10.1134/S1021443716060030>.
- Demetriou, Georgia, Christina Neonaki, Eleni Navakoudis, and Kiriakos Kotzabasis. 2007. "Salt Stress Impact on the Molecular Structure and Function of the Photosynthetic Apparatus-The Protective Role of Polyamines." *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* 1767 (4): 272–80. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2007.02.020>.
- Dickson, D M, R G Wyn Jones, and J Davenport. 1982. "Osmotic Adaptation in Ulva Lactuca under Fluctuating Salinity Regimes." *Planta* 155 (5): 409–15. <https://doi.org/10.1007/BF00394469>.
- Dittami, Simon M., Antoine Gravot, Sophie Goulitquer, Sylvie Rousvoal, Akira F. Peters, Alain Bouchereau, Catherine Boyen, and Thierry Tonon. 2012. "Towards Deciphering Dynamic Changes and Evolutionary Mechanisms Involved in the Adaptation to Low Salinities in Ectocarpus (Brown Algae)." *Plant Journal* 71 (3): 366–77. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2012.04982.x>.
- Edwards, D M, R H Reed, and W D P Stewart. 1988. "Osmoacclimation in Enteromorpha Intestinalis: Long-Term Effects of Osmotic Stress on Organic Solute Accumulation." *Marine Biology* 98 (4): 467–76. <https://doi.org/10.1007/BF00391537>.
- Falkowski, Paul, Tom Fenchel, and Edward Delong. 2008. "The Microbial Engines That Drive Earth's Biogeochemical Cycles." *Science (New York, N.Y.)* 320 (June): 1034–39. <https://doi.org/10.1126/science.1153213>.
- Falkowski, Paul G., Tom Fenchel, and Edward F. Delong. 2008. "The Microbial Engines That Drive Earth's Biogeochemical Cycles." *Science* 320 (5879): 1034–39. <https://doi.org/10.1126/science.1153213>.
- Foflonker, Fatima, Devin Mollegard, Meichin Ong, Hwan Su Yoon, and Debashish Bhattacharya. 2018. "Genomic Analysis of Picochlorum Species ReFoflonker, F., Mollegard, D., Ong, M., Yoon, H. S., & Bhattacharya, D. (2018). Genomic Analysis of Picochlorum Species Reveals How Microalgae May Adapt to Variable Environments. Molecular Biology and Evolution, 35." *Molecular Biology and Evolution* 35 (11): 2702–11. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy167>.

- Foissner, W. 1999. "Protist Diversity: Estimates of the near-Imponderable." *Protist* 150 (4): 363–68. [https://doi.org/10.1016/S1434-4610\(99\)70037-4](https://doi.org/10.1016/S1434-4610(99)70037-4).
- Frenkel, Johannes, Wim Vyverman, and Georg Pohnert. 2014. "Pheromone Signaling during Sexual Reproduction in Algae." *Plant Journal* 79 (4): 632–44. <https://doi.org/10.1111/tpj.12496>.
- Fu, Weiqi, Giuseppe Paglia, Manuela Magnúsdóttir, Elin A. Steinarsdóttir, Steinn Gudmundsson, Bernhard T. Palsson, Ólafur S. Andrésson, and Sigurdur Brynjólfsson. 2014. "Effects of Abiotic Stressors on Lutein Production in the Green Microalga *Dunaliella Salina*." *Microbial Cell Factories* 13 (1): 1–9. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-3>.
- Gargiulo, G. M., G. Genovese, M. Morabito, F. Culoso, and F. De Masi. 2001. "Sexual and Asexual Reproduction in a Freshwater Population of *Bangia Atropurpurea* (Bangiales, Rhodophyta) from Eastern Sicily (Italy)." *Phycologia* 40 (1): 88–96. <https://doi.org/10.2216/i0031-8884-40-1-88.1>.
- Gessner, F., and L. Hammer. 1968. "Exosmosis and 'Free Space' in Marine Benthic Algae." *Marine Biology* 2 (1): 88–91. <https://doi.org/10.1007/BF00351644>.
- Giovannoni, Stephen J., and Ulrich Stingl. 2005. "Molecular Diversity and Ecology of Microbial Plankton." *Nature* 437 (7057): 343–48. <https://doi.org/10.1038/nature04158>.
- Hahn, Martin W. 2006. "The Microbial Diversity of Inland Waters." *Current Opinion in Biotechnology* 17 (3): 256–61. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2006.05.006>.
- Haines, P. W., M. Hand, and M. Sandiford. 2001. "Palaeozoic Synorogenic Sedimentation in Central and Northern Australia: A Review of Distribution and Timing with Implications for the Evolution of Intracontinental Orogens." *Australian Journal of Earth Sciences* 48 (6): 911–28. <https://doi.org/10.1046/j.1440-0952.2001.00909.x>.
- Haq, Bilal U., Jan Hardenbol, and Peter R. Vail. 1987. "Chronology of Fluctuating Sea Levels since the Triassic." *Science* 235 (4793): 1156–67. <https://doi.org/10.1126/science.235.4793.1156>.
- Hay, William W., Areg Migdisov, Alexander N. Balukhovskiy, Christopher N. Wold, Sascha Flögel, and Emanuel Söding. 2006. "Evaporites and the Salinity of the Ocean during the Phanerozoic: Implications for Climate, Ocean Circulation and Life." *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 240 (1–2): 3–46. <https://doi.org/10.1016/j.palaeo.2006.03.044>.
- Huston, David L., Sally Pehrsson, Bruce M. Eglinton, and Khin Zaw. 2010. "The Geology and Metallogeny of Volcanic-Hosted Massive Sulfide Deposits: Variations through Geologic Time and with Tectonic Setting." *Economic Geology* 105 (3): 571–91. <https://doi.org/10.2113/gsecongeo.105.3.571>.
- Ichihara, Kensuke, Shogo Arai, and Satoshi Shimada. 2009. "cDNA Cloning of a Lectin-like Gene Preferentially Expressed in Freshwater from the Macroalga *Ulva Limnetica* (Ulvales, Chlorophyta)." *Phycological Research* 57 (2): 104–10. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1835.2009.00526.x>.
- Ichihara, Kensuke, Frederic Mineur, and Satoshi Shimada. 2011. "Isolation and Temporal Expression Analysis of Freshwater-Induced Genes in *Ulva Limnetica* (Ulvales, Chlorophyta)." *Journal of Phycology* 47 (3): 584–90. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2011.01001.x>.
- Jackson, Christopher, Susan Clayden, and Adrian Reyes-Prieto. 2015. "The Glaucophyta: The Blue-Green Plants in a Nutshell." *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 84 (2): 149–65. <https://doi.org/10.5586/asbp.2015.020>.
- Jackson, Christopher J., and Adrian Reyes-Prieto. 2014. "The Mitochondrial Genomes of the Glaucophytes *Gloeochaete Wittrockiana* and *Cyanoptycha Gloeocystis*: Multilocus Phylogenetics Suggests Amonophyletic Archaeplastida." *Genome Biology and Evolution* 6 (10): 2774–85. <https://doi.org/10.1093/gbe/evu218>.



- Jeong, Minseok, Jong Im Kim, Bok Yeon Jo, Han Soon Kim, Peter A. Siver, and Woongghi Shin. 2019. "Surviving the Marine Environment: Two New Species of Mallomonas (Synurophyceae)." *Phycologia* 00(00): 1–11. <https://doi.org/10.1080/00318884.2019.1565718>.
- Johnston, D. T., F. Wolfe-Simon, A. Pearson, and A. H. Knoll. 2009. "Anoxygenic Photosynthesis Modulated Proterozoic Oxygen and Sustained Earth's Middle Age." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (40): 16925–29. <https://doi.org/10.1073/pnas.0909248106>.
- Kakinuma, Makoto, Yoshinao Kuno, and Hideomi Amano. 2004. "Salinity Stress Responses of a Sterile Mutant of *Ulva Pertusa* (Ulvales, Chlorophyta)." *Fisheries Science* 70 (6): 1177–79. <https://doi.org/10.1111/j.1444-2906.2004.00921.x>.
- Kalvas, A., and L. Kautsky. 1998. "Morphological Variation in *Fucus Vesiculosus* Populations along Temperature and Salinity Gradients in Iceland." *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 78 (3): 985–1001. <https://doi.org/10.1017/s0025315400044921>.
- Kamer, Krista, and Peggy Fong. 2000. "A Fluctuating Salinity Regime Mitigates the Negative Effects of Reduced Salinity on the Estuarine Macroalga, *Enteromorpha Intestinalis* (L.) Link." *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 254 (1): 53–69. [https://doi.org/10.1016/S0022-0981\(00\)00262-8](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(00)00262-8).
- Keeling, Patrick J. 2010. "The Endosymbiotic Origin, Diversification and Fate of Plastids." *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 365 (1541): 729–48. <https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0103>.
- Khona, Dolly K., Seema M. Shirolikar, Kanak K. Gawde, Erik Hom, Manjushree A. Deodhar, and Jacinta S. D'Souza. 2016. "Characterization of Salt Stress-Induced Palmelloids in the Green Alga, *Chlamydomonas Reinhardtii*." *Algal Research* 16: 434–48. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.03.035>.
- Kirst, G. O. 1990. "Salinity Tolerance of Eukaryotic Marine Algae." *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 41 (1): 21–53. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.41.060190.000321>.
- Kloareg, Bernard, and Ralph S Quatrano. 1988. "Structure of the Cell Walls of Marine Algae and Ecophysiological Functions of the Matrix Polysaccharides." In .
- Komsic-Buchmann, Karin, Luisa Wöstehoff, and Burkhard Becker. 2014. "The Contractile Vacuole as a Key Regulator of Cellular Water Flow in *Chlamydomonas Reinhardtii*." *Eukaryotic Cell* 13 (11): 1421–30. <https://doi.org/10.1128/EC.00163-14>.
- Lachapelle, Josianne, Graham Bell, and Nick Colegrave. 2015. "Experimental Adaptation to Marine Conditions by a Freshwater Alga." *Evolution* 69 (10): 2662–75. <https://doi.org/10.1111/evo.12760>.
- Lee, C E, and M A Bell. 1999. "Causes and Consequences of Recent Freshwater." *Tree* 14 (7): 284–88. marine biology.
- Leliaert, Frederik, David R. Smith, Hervé Moreau, Matthew D. Herron, Heroen Verbruggen, Charles F. Delwiche, and Olivier De Clerck. 2012. "Phylogeny and Molecular Evolution of the Green Algae." *Critical Reviews in Plant Sciences* 31 (1): 1–46. <https://doi.org/10.1080/07352689.2011.615705>.
- Li, Yantao, Milton Sommerfeld, Feng Chen, and Qiang Hu. 2008. "Consumption of Oxygen by Astaxanthin Biosynthesis: A Protective Mechanism against Oxidative Stress in *Haematococcus Pluvialis* (Chlorophyceae)." *Journal of Plant Physiology* 165 (17): 1783–97. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2007.12.007>.

- Logares, Ramiro, Jon Bråte, Stefan Bertilsson, Jessica L. Clasen, Kamran Shalchian-Tabrizi, and Karin Rengefors. 2009. "Infrequent Marine-Freshwater Transitions in the Microbial World." *Trends in Microbiology* 17 (9): 414–422. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2009.05.010>.
- Logares, Ramiro, Kamran Shalchian-Tabrizi, Andrés Boltovskoy, and Karin Rengefors. 2007. "Extensive Dinoflagellate Phylogenies Indicate Infrequent Marine-Freshwater Transitions." *Molecular Phylogenetics and Evolution* 45 (3): 887–903. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2007.08.005>.
- Lozupone, Catherine A., and Rob Knight. 2007. "Global Patterns in Bacterial Diversity." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (27): 11436–40. <https://doi.org/10.1073/pnas.0611525104>.
- Lurling, M., and W. Beekman. 2006. "Palmelloids Formation in *Chlamydomonas Reinhardtii*: Defence against Rotifer Predators?" *Annales de Limnologie* 42 (2): 65–72. <https://doi.org/10.1051/limn/2006010>.
- Lyon, Barbara R., Peter A. Lee, Jennifer M. Bennett, Giacomo R. di Tullio, and Michael G. Janech. 2011. "Proteomic Analysis of a Sea-Ice Diatom: Salinity Acclimation Provides New Insight into the Dimethylsulfoniopropionate Production Pathway." *Plant Physiology* 157 (4): 1926–41. <https://doi.org/10.1104/pp.111.185025>.
- Martin, William, John Baross, Deborah Kelley, and Michael J. Russell. 2008. "Hydrothermal Vents and the Origin of Life." *Nature Reviews Microbiology* 6 (11): 805–14. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1991>.
- Martins, Irene, José Miguel Oliveira, Morgens R. Flindt, and João Carlos Marques. 1999. "The Effect of Salinity on the Growth Rate of the Macroalgae *Enteromorpha Intestinalis* (Chlorophyta) in the Mondego Estuary (West Portugal)." *Acta Oecologica* 20 (4): 259–65. [https://doi.org/10.1016/S1146-609X\(99\)00140-X](https://doi.org/10.1016/S1146-609X(99)00140-X).
- Martiny, Jennifer B., Brendan J.M. Bohannan, James H. Brown, Robert K. Colwell, Jed A. Fuhrman, Jessica L. Green, M. Claire Horner-Devine, et al. 2006. "Microbial Biogeography: Putting Microorganisms on the Map." *Nature Reviews Microbiology* 4 (2): 102–12. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1341>.
- McFadden, Geoffrey I. 2014. "Origin and Evolution of Plastids and Photosynthesis in Eukaryotes." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 6 (4): 1–9. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016105>.
- Mes, Ted H.M. 2008. "Microbial Diversity - Insights from Population Genetics." *Environmental Microbiology* 10 (1): 251–64. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01449.x>.
- Mostaert, Anikas S., David A. Orlovich, and Robert J. King. 1996. "Ion Compartmentation in the Red Alga *Caloglossa Leprieurii* in Response to Salinity Changes: Freeze-Substitution and X-Ray Microanalysis." *New Phytologist* 132 (3): 513–19. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1996.tb01871.x>.
- Mulkidjanian, Armen Y., Eugene V Koonin, Kira S Makarova, Sergey L Mekhedov, Alexander Sorokin, Yuri I Wolf, Alexis Dufresne, et al. 2006. "The Cyanobacterial Genome Core and the Origin of Photosynthesis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (35): 13126–31. <https://doi.org/10.1073/pnas.0605709103>.
- Murata, Norio, and Mitsue Miyao. 1985. "Extrinsic Membrane Proteins in the Photosynthetic Oxygen-Evolving Complex." *Trends in Biochemical Sciences* 10 (3): 122–24. [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(85\)90272-5](https://doi.org/10.1016/0968-0004(85)90272-5).

- Nakov, Teofil, Jeremy M. Beaulieu, and Andrew J. Alverson. 2019. "Diatoms Diversify and Turn over Faster in Freshwater than Marine Environments\*." *Evolution* 73 (12): 2497–2511. <https://doi.org/10.1111/evo.13832>.
- Němcová, Yvonne, Martin Pusztai, Magda Škaloudová, and Jiří Neustupa. 2016. "Silica-Scaled Chrysophytes (Stramenopiles, Ochrophyta) along a Salinity Gradient: A Case Study from the Gulf of Bothnia Western Shore (Northern Europe)." *Hydrobiologia* 764 (1): 187–97. <https://doi.org/10.1007/s10750-015-2424-9>.
- Noctor, Graham, and Christine H. Foyer. 1998. "ASCORBATE AND GLUTATHIONE: Keeping Active Oxygen Under Control." *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49 (1): 249–79. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.49.1.249>.
- Ochoa De Alda, Jesús A.G., Rocío Esteban, María Luz Diago, and Jean Houmard. 2014. "The Plastid Ancestor Originated among One of the Major Cyanobacterial Lineages." *Nature Communications* 5. <https://doi.org/10.1038/ncomms5937>.
- Oren, Aharon. 2001. "The Bioenergetic Basis for the Decrease in Metabolic Diversity at Increasing Salt Concentrations: Implications for the Functioning of Salt Lake Ecosystems." *Hydrobiologia* 466: 61–72. <https://doi.org/10.1023/A:1014557116838>.
- Paasche, E., S. Johansson, and D. L. Evensen. 1975. "An Effect of Osmotic Pressure on the Valve Morphology of the Diatom *Skeletonema subsalsum* (A. Cleve) Bethge." *Phycologia* 14 (4): 205–11. <https://doi.org/10.2216/i0031-8884-14-4-205.1>.
- Perrineau, Marie-Mathilde, Ehud Zelzion, Jeferson Gross, Dana C Price, Jeffrey Boyd, and Debashish Bhattacharya. 2014. "Evolution of Salt Tolerance in a Laboratory Reared Population of *Chlamydomonas Reinhardtii*." *Environmental Microbiology* 16 (6): 1755–66. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12372>.
- Pinti, Daniele. 2005. "The Origin and Evolution of the Oceans." In *Lect Astrobiol*, 1:83–112. [https://doi.org/10.1007/10913406\\_4](https://doi.org/10.1007/10913406_4).
- Ponce-Toledo, Rafael I., Philippe Deschamps, Purificación López-García, Yvan Zivanovic, Karim Benzerara, and David Moreira. 2017. "An Early-Branching Freshwater Cyanobacterium at the Origin of Plastids." *Current Biology* 27 (3): 386–91. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.11.056>.
- Popper, Zoë A, Gurvan Michel, Cécile Hervé, David S Domozych, William G T Willats, Maria G Tuohy, Bernard Kloareg, and Dagmar B Stengel. 2011. "Evolution and Diversity of Plant Cell Walls: From Algae to Flowering Plants." *Annual Review of Plant Biology* 62: 567–90. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042110-103809>.
- Qiu, Huan, Dana C. Price, Eun Chan Yang, Hwan Su Yoon, and Debashish Bhattacharya. 2015. "Evidence of Ancient Genome Reduction in Red Algae (Rhodophyta)." *Journal of Phycology* 51 (4): 624–36. <https://doi.org/10.1111/jpy.12294>.
- Raven, John A. 1999. "CONSTRAINTS ON MARINE ALGAL INVASION OF LOW-SALINITY ENVIRONMENTS: SEX IN THE BALTIC." *Journal of Phycology* 35 (2): 210–14. <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.1999.3520210.x>.
- Reed, Robert H. 1985. "Osmoacclimation in *Bangia atropurpurea* (Rhodophyta, Bangiales): The Osmotic Role of Floridoside." *British Phycological Journal* 20 (3): 211–18. <https://doi.org/10.1080/00071618500650221>.
- Remias, Daniel, Lenka Procházková, Linda Nedbalová, Robert A. Andersen, and K. Valentin. 2020. "Two New *Kremastochryopsis* Species, *K. austriaca* Sp. Nov. and *K. americana* Sp. Nov. (Chrysophyceae)1." *Journal of Phycology* 56 (1): 135–45. <https://doi.org/10.1111/jpy.12937>.
- Reyes-Prieto, Adrian, and Debashish Bhattacharya. 2007. "Phylogeny of Nuclear-Encoded Plastid-Targeted Proteins Supports an Early Divergence of Glaucophytes within Plantae." *Molecular*

- Biology and Evolution* 24 (11): 2358–61. <https://doi.org/10.1093/molbev/msm186>.
- Riaux-Gobin, C., and K. Stumm. 2006. “Modern Archaeomonadaceae from the Land-Fast Ice off Adélie Land, East Antarctica: A Preliminary Report.” *Antarctic Science* 18 (1): 51–60. <https://doi.org/10.1017/S0954102006000046>.
- Ritchie, Raymond J., and A. W.D. Larkum. 1985. “Potassium Transport in *Enteromorpha Intestinalis* (L.) Link: II. Effects of Medium Composition and Metabolic Inhibitors.” *Journal of Experimental Botany* 36 (3): 394–412. <https://doi.org/10.1093/jxb/36.3.394>.
- Rodríguez-Ezpeleta, Naiara, Henner Brinkmann, Suzanne C. Burey, Béatrice Roure, Gertraud Burger, Wolfgang Löffelhardt, Hans J. Bohnert, Hervé Philippe, and B. Franz Lang. 2005. “Monophyly of Primary Photosynthetic Eukaryotes: Green Plants, Red Algae, and Glaucophytes.” *Current Biology* 15 (14): 1325–30. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.06.040>.
- Ronald J, Gibbs. 1970. “Mechanisms Controlling World Water Chemistry.” *Science* 170 (3962): 1088–90.
- Satoh, K, C M Smith, and D C Fork. 1983. “Effects of Salinity on Primary Processes of Photosynthesis in the Red Alga *Porphyra Perforata*.” *Plant Physiology* 73 (3): 643–47. <https://doi.org/10.1104/pp.73.3.643>.
- Sfriso, A., A. Marcomini, and B. Pavoni. 1987. “Relationships between Macroalgal Biomass and Nutrient Concentrations in a Hypertrophic Area of the Venice Lagoon.” *Marine Environmental Research* 22 (4): 297–312. [https://doi.org/10.1016/0141-1136\(87\)90005-5](https://doi.org/10.1016/0141-1136(87)90005-5).
- Sheath, Robert G., and Kathleen M. Cole. 1980. “Distribution and Salinity Adaptations of *Bangia Atropurpurea* (Rhodophyta), a Putative Migrant Into the Laurentian Great Lakes.” *Journal of Phycology*. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.1980.tb03053.x>.
- Shetty, Prateek, Margaret Mukami Gitau, and Gergely Maróti. 2019. “Salinity Stress Responses and Adaptation Mechanisms in Eukaryotic Green Microalgae.” *Cells* 8 (12): 1657. <https://doi.org/10.3390/cells8121657>.
- Singh, R., A. K. Upadhyay, P. Chandra, and D. P. Singh. 2018. “Sodium Chloride Incites Reactive Oxygen Species in Green Algae *Chlorococcum Humicola* and *Chlorella Vulgaris*: Implication on Lipid Synthesis, Mineral Nutrients and Antioxidant System.” *Bioresource Technology* 270: 489–97. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.09.065>.
- Subramanyam, Rajagopal, Craig Jolley, Balakumar Thangaraj, Sreedhar Nellaepalli, Andrew N. Webber, and Petra Fromme. 2010. “Structural and Functional Changes of PSI-LHCI Supercomplexes of *Chlamydomonas Reinhardtii* Cells Grown under High Salt Conditions.” *Planta* 231 (4): 913–22. <https://doi.org/10.1007/s00425-009-1097-x>.
- Tappan, Helen Niña. 1980. *The Paleobiology of Plant Protists*. San Francisco: W.H. Freeman.
- Tatarenkov, A., L. Bergström, R. B. Jönsson, E. A. Serrão, L. Kautsky, and K. Johannesson. 2005. “Intriguing Asexual Life in Marginal Populations of the Brown Seaweed *Fucus Vesiculosus*.” *Molecular Ecology* 14 (2): 647–51. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02425.x>.
- Underwood, Graham J.C., James Phillips, and Karen Saunders. 1998. “Distribution of Estuarine Benthic Diatom Species along Salinity and Nutrient Gradients.” *European Journal of Phycology* 33 (2): 173–83. <https://doi.org/10.1080/09670269810001736673>.
- Vermeij, Geerat J., and Robert Dudley. 2000. “Why Are There so Few Evolutionary Transitions between Aquatic and Terrestrial Ecosystems?” *Biological Journal of the Linnean Society* 70 (4): 541–54. <https://doi.org/10.1006/bijl.1999.0415>.
- Wang, Ning, Zhixin Qian, Manwei Luo, Shoujin Fan, Xuejie Zhang, and Luoyan Zhang. 2018. “Identification of Salt Stress Responding Genes Using Transcriptome Analysis in Green Alga

- Chlamydomonas Reinhardtii.” *International Journal of Molecular Sciences* 19 (11).  
<https://doi.org/10.3390/ijms19113359>.
- Wegmann, Klaus. 1986. “Osmoregulation in Eukaryotic Algae.” *FEMS Microbiology Letters* 39 (1–2): 37–43. [https://doi.org/10.1016/0378-1097\(86\)90058-3](https://doi.org/10.1016/0378-1097(86)90058-3).
- Weisse, Thomas. 2008. “Distribution and Diversity of Aquatic Protists: An Evolutionary and Ecological Perspective.” *Biodiversity and Conservation* 17 (2): 243–59.  
<https://doi.org/10.1007/s10531-007-9249-4>.
- Wellman, Charles H., and Paul K. Strother. 2015. “The Terrestrial Biota Prior to the Origin of Land Plants (Embryophytes): A Review of the Evidence.” *Palaeontology* 58 (4): 601–27.  
<https://doi.org/10.1111/pala.12172>.
- Wit, Rutger De, and Thierry Bouvier. 2006. ““Everything Is Everywhere, but, the Environment Selects’; What Did Baas Becking and Beijerinck Really Say?”” *Environmental Microbiology* 8 (4): 755–58. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01017.x>.
- Xia, Jianrong, Yongjun Li, and Dinghui Zou. 2004. “Effects of Salinity Stress on PSII in *Ulva Lactuca* as Probed by Chlorophyll Fluorescence Measurements.” *Aquatic Botany* 80 (2): 129–37.  
<https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2004.07.006>.